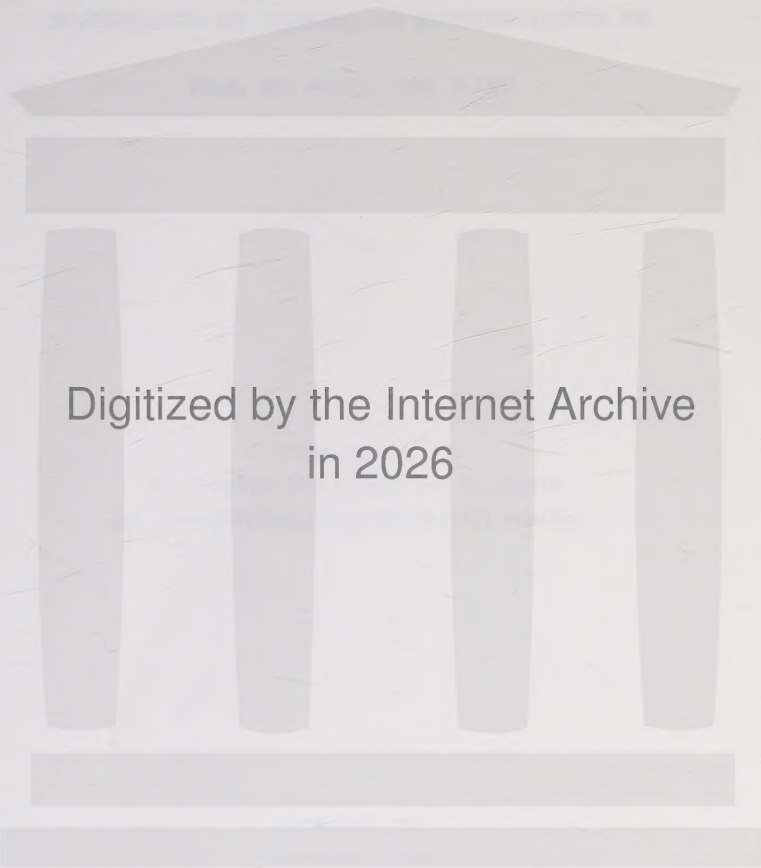


UNTERSUCHUNGEN ZUR REINIGUNG  
UND CHARAKTERISIERUNG VON  
HBeAg AUS MENSCHLICHEM PLASMA

Bernhard Bayerl

Diss  
offiziell  
1985





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554004\\_0044](https://archive.org/details/IA41554004_0044)



UNTERSUCHUNGEN ZUR REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON

HBeAg AUS MENSCHLICHEM PLASMA

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Bernhard Bayerl

München, Juni 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

Tag der mündlichen Prüfung: 29. 11. 1985

Quid mihi, Livor edax,  
ignavis obicis annos,  
ingenii que vocas  
carmen inertis opus...

Ovid



Der Verfasser stellt sich als Schüler des Herrn Dr. H. an und bittet um  
Bewilligung seiner Bitte, dass er die Erlaubnis erhält, sich an der  
Hochschule zu beurlauben, um an der Universität zu studieren.  
Dr. H. antwortet darauf:

Sehr geehrter Herr, ich habe Ihre Bitte mit Interesse gelesen und  
begehe mich, Sie die Erlaubnis zu erteilen, dass Sie sich an der  
Universität zu beurlauben, um an der Universität zu studieren.  
Meinen Eltern

Ich habe Ihre Bitte mit Interesse gelesen und begehe mich, Sie die  
Erlaubnis zu erteilen, dass Sie sich an der Universität zu beurlauben,  
um an der Universität zu studieren.

Sehr geehrter Herr, ich habe Ihre Bitte mit Interesse gelesen und  
begehe mich, Sie die Erlaubnis zu erteilen, dass Sie sich an der  
Universität zu beurlauben, um an der Universität zu studieren.

Ich habe Ihre Bitte mit Interesse gelesen und begehe mich, Sie die  
Erlaubnis zu erteilen, dass Sie sich an der Universität zu beurlauben,  
um an der Universität zu studieren.

Sehr geehrter Herr, ich habe Ihre Bitte mit Interesse gelesen und  
begehe mich, Sie die Erlaubnis zu erteilen, dass Sie sich an der  
Universität zu beurlauben, um an der Universität zu studieren.

Ich habe Ihre Bitte mit Interesse gelesen und begehe mich, Sie die  
Erlaubnis zu erteilen, dass Sie sich an der Universität zu beurlauben,  
um an der Universität zu studieren.



Die vorliegende Arbeit wurde von Februar 1979 bis Juni 1984 am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. F. Deinhardt danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die großzügige finanzielle und fachliche Unterstützung, die er dieser Arbeit zuteil werden ließ.

Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie und für sein kontinuierliches Interesse am Fortgang der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. G. G. Frösner danke ich für die Überlassung des Themas und seine stets offene Tür, wenn es galt, die immer wieder auftretenden Probleme zu diskutieren.

Herrn Priv. Doz. Dr. L. Gürtler danke ich besonders für sein Engagement und die vielfältige Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit.

Herrn Dr. habil. K. v.d. Helm danke ich für die fachlichen Diskussionen.

Allen Mitarbeitern im Max von Pettenkofer-Institut, besonders aber Frau Dr. Regine Scheid, Frl. staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin Renate Kühbeck, Herrn Prof. Dr. Dr. habil. H. Wolf und Dr. G.J. Bayliss danke ich für die mir entgegengebrachte Freundschaft und das hilfreiche Interesse an der Arbeit.



## Inhaltsverzeichnis

|                                                                            | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------|-------|
| I. Einleitung                                                              | 1     |
| I.1 Allgemeines                                                            | 1     |
| I.2 Geschichtlicher Überblick                                              | 1     |
| I.3 Serologischer und klinischer Verlauf der<br>Hepatitis-B-Infektion      | 2     |
| I.4 Aufbau des Hepatitis-B-Virus                                           | 3     |
| I.5 Virusproteine                                                          | 4     |
| I.5.1 Hepatitis-B-Oberflächen (surface) -Antigen (HBsAg)                   | 4     |
| I.5.2 Hepatitis-B-Core-Antigen (HBcAg) und<br>Hepatitis-Be-Antigen (HBeAg) | 5     |
| I.6 Nachweis von HBV-Proteinen                                             | 10    |
| I.7 Aufgabenstellung                                                       | 11    |
| II. Material                                                               | 12    |
| II.1 Abkürzungen                                                           | 12    |
| II.1.1 Biologisches Material                                               | 12    |
| II.1.2 Reagentien                                                          | 12    |
| II.1.3 Einheiten                                                           | 13    |
| II.1.4 Sonstiges                                                           | 13    |

|       |                                                                                   |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| II.2  | Nachweis von HBV-Markern                                                          | 14 |
| II.3  | Quantitative Bestimmung von Albumin und IgG                                       | 14 |
| II.4  | Chemikalien und andere Materialien                                                | 14 |
| II.5  | Antigenquelle                                                                     | 16 |
| II.6  | Antiserum                                                                         | 16 |
| II.7  | Puffer und Lösungen                                                               | 16 |
| III.  | Methoden                                                                          | 19 |
| III.1 | Nachweis des HBeAg mit Hilfe eines<br>Radioimmuntests                             | 19 |
| III.2 | Bestimmung des HBeAg-Titers und Quantifizierung                                   | 21 |
| III.3 | Nachweis des HBcAg mit Hilfe eines Radioimmuntests                                | 21 |
| III.4 | Nachweis der HBV-spezifischen DNA-Polymerase                                      | 22 |
| III.5 | Nachweis von HBsAg, Delta-Ag, anti-HBc und anti-HAV                               | 22 |
| III.6 | Nachweis von IgG-Antikörpern gegen andere DNA-Viren                               | 22 |
| III.7 | Bestimmung des Proteingehalts in Lösungen                                         | 23 |
| III.8 | Quantitative Bestimmung von Immunglobulin G<br>und Albumin aus menschlichen Seren | 23 |

|          |                                                                                         |    |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.9    | Reinigung des HBeAg aus Plasma                                                          | 25 |
| III.9.1  | Entfernen von Detritus und Dane-<br>Partikeln aus menschlichem Plasma                   | 25 |
| III.9.2  | Ammoniumsulfatpräzipitation                                                             | 25 |
| III.9.3  | Dialyse gegen destilliertes Wasser                                                      | 26 |
| III.9.4  | Chromatographie an Phenylsepharose                                                      | 26 |
| III.9.5  | Isoelektrische Fokussierung im<br>granulierten Gel                                      | 27 |
| III.9.6  | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)                                           | 28 |
| III.9.7  | Färbeverfahren der SDS-Polyacryl-<br>amidgele                                           | 29 |
| III.9.8  | Semipräparative SDS-Polyacrylamid-<br>gelelektrophorese                                 | 32 |
| III.9.9  | Elution von HBeAg aus Polyacryl-<br>amidgelen                                           | 32 |
| III.9.10 | Entfernung von SDS aus PAGE-Eluaten                                                     | 32 |
| III.10   | Isoelektrische Fokussierung in Polyacryl-<br>amidgelen                                  | 33 |
| III.11   | Aminosäurenanalyse                                                                      | 35 |
| III.12   | Spaltung von Peptidbindungen am C-Terminus<br>von Methionin durch Cyanogenbromid (CNBr) | 35 |
| IV.      | Ergebnisse                                                                              | 37 |
| IV.1     | Bestimmung von HBeAg durch Radioimmunoassay                                             | 37 |
| IV.1.1   | Bestimmung der Spezifität des Tests zum<br>Nachweis von HBeAg                           | 37 |
| IV.1.2   | Präzision und Linearität des<br>HBeAg-Tests                                             | 38 |
| IV.1.3   | Quantitative Bestimmung von HBeAg                                                       | 40 |

|        |                                                                                                                             |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| IV.1.4 | Einfluß des Verdünnungsgrades auf die<br>Mindestzählrate                                                                    | 41 |
| IV.1.5 | Einfluß von SDS auf den immunologischen<br>Nachweis von HBeAg                                                               | 42 |
| IV.1.6 | Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf den<br>immunologischen Nachweis von HBeAg                                                 | 43 |
| IV.1.7 | Einfluß der Proteinmenge auf das Ergebnis<br>des HBeAg-RIAs                                                                 | 44 |
| IV.1.8 | Bestimmung von HBcAg durch Radioimmunassay                                                                                  | 45 |
| IV.2   | Eigenschaften des zur Reinigung benutzten Plasmas                                                                           | 47 |
| IV.3   | Reinigung                                                                                                                   | 48 |
| IV.3.1 | Zentrifugation partikulärer Plasma-<br>bestandteile                                                                         | 48 |
| IV.3.2 | Ammoniumsulfatpräzipitation                                                                                                 | 48 |
| IV.3.3 | Phenylsepharose-Chromatographie                                                                                             | 51 |
| IV.3.4 | Kontrolle des erzielten Reinigungs-<br>effektes durch zweidimensionale<br>Elektrophorese                                    | 53 |
| IV.3.5 | Semipräparative isoelektrische<br>Fokussierung im granulierten Gel                                                          | 54 |
| IV.3.6 | Semipräparative SDS-Polyacrylamid-<br>gelelektrophorese                                                                     | 57 |
| IV.4   | Kontrolle der elektrophoretischen Reinheit des<br>eluierten HBeAg durch analytische SDS-Poly-<br>acrylamidgelelektrophorese | 58 |
| IV.5   | Bilanz der Reinigung von HBeAg aus mensch-<br>lichem Plasma                                                                 | 59 |
| IV.6   | Berechnung der Nachweisempfindlichkeit des HBeAg-Tests                                                                      | 60 |
| IV.7   | SDS-Entfernung von HBeAg-positivem Material                                                                                 | 60 |

|                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|
| IV.8 Aminosäurenbruttozusammensetzung des gereinigten Materials | 61 |
| IV.9 Bestimmung des isoelektrischen Punktes von HBeAg           | 63 |
| IV.10 Spaltung von HBeAg durch CNBr                             | 64 |
| IV.11 Behandlung von HBeAg mit Protease V8                      | 65 |
| V. Diskussion                                                   | 66 |
| VI. Zusammenfassung                                             | 74 |
| VII. Literaturverzeichnis                                       | 75 |



## I: EINLEITUNG:

### I.1: Allgemeines:

Das menschliche Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein Mitglied der Gruppe der Hepadna-Viren, zu denen als weitere nicht humanpathogene Vertreter das Woodchuck-Hepatitis-Virus (Summers et al., 1978a; Popper et al., 1981; Ogston et al., 1982), das Ground Squirrel-Hepatitis-Virus (Marion et al., 1980b) und das Duck-Hepatitis-Virus gehören (Mason et al., 1980; Robinson et al., 1982; O'Connell et al., 1983). Das HBV ist von großem medizinischen Interesse, da es zum einen bei 5-10% der Erkrankten eine chronische Hepatitis auslöst (Roggendorf und Deinhardt, 1982), zum anderen an der Entstehung des Leberzellkarzinoms beteiligt ist (Zuckerman, 1974; Summers et al., 1978b; Marion et al., 1980a; Prince, 1981; Shafritz and Kew, 1981). Der Mechanismus für die Induktion beider Krankheiten ist bis heute unbekannt.

### I.2: Geschichtlicher Überblick:

1885 berichtete Lürman (Lürman, 1885) erstmals über eine Epidemie von "Serumhepatitis", die nach einer Impfkampagne gegen Pocken ausgebrochen war. Erst 1965 entdeckte Blumberg das "Australia-Antigen", das Oberflächenantigen des HBV (Hepatitis-B-Surface-Antigen, HBsAg) (Blumberg et al., 1965). 1970 konnte Dane den Erreger der Hepatitis B, ein 42 nm großes Partikel im Serum von an Hepatitis B Erkrankten nachweisen (Dane et al., 1970). Im Jahr 1972 wurde von Magnius und Espmark (Magnius and Espmark, 1972) in Patientenseren das Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg) als weiteres HBV-assoziiertes Antigen entdeckt. 1979 folgte die Entdeckung von HBeAg-Aktivität im Kern der Dane-Partikel (Neurath and Strick, 1979; Ohori et al., 1979; Takahashi et al., 1979; Yoshizawa et al., 1979). Kaplan und Mitarbeiter beschrieben 1973 eine DNA-abhängige DNA-Polymerase im Viruspartikel, 1980 wurde in ihm HBV-assoziierte Kinaseaktivität nachgewiesen (Albin and Robinson, 1980; v. d. Helm et al., 1980).

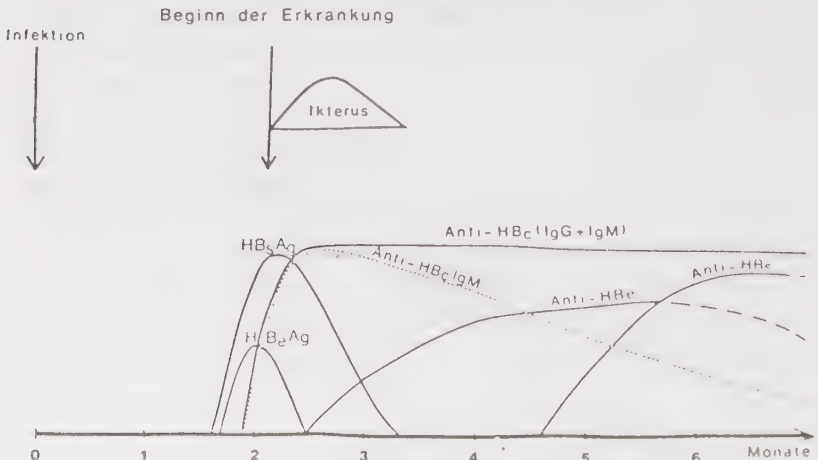
### I.3: Serologischer und klinischer Verlauf der Hepatitis-B-Infektion:

Die Hepatitis B wird im allgemeinen parenteral durch Blut oder Blutprodukte übertragen. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Wochen ist bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome das HBsAg im Serum des Patienten nachweisbar. Mit Beginn der Erkrankung findet man Antikörper gegen Hepatitis-B-core-Antigen (anti-HBc) und häufig Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg). Der serologische Verlauf einer akuten Infektion mit dem Hepatitis B Virus ist in Abbildung 1 dargestellt.

Der Beweis für die Infektiosität eines Serums, das heißt für das Vorhandensein von infektiösen Viruspartikeln, kann durch eine positive Polymerasereaktion geführt werden (Robinson, W.S., 1975). Der Nachweis von HBeAg in hohen Titern ist ebenfalls eng mit der Infektiosität des Serums korreliert (Alter et al., 1976; Howard, 1978; Bonino et al., 1981). Zusätzlich kann eine elektronenoptische Untersuchung von zentrifugiertem Serum weitere Hinweise auf das Vorhandensein von HBV erbringen.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des serologischen Verlaufs einer akuten Hepatitis-B-Infektion:

Hepatitis-Diagnostikabteilung des Max von Pettenkofer-Instituts  
(Modifiziert nach Frösner et al., 1978)



Darstellung des durchschnittlichen zeitlichen Verlaufs einer HBV-Infektion. Replizierte Virusproteine werden durch Antikörper, die vom Körper als Immunantwort gebildet werden, eliminiert. Nach ca. 6 Monaten läßt der bestehende Antikörperstatus einen Rückschluß auf

Während bei normalem Verlauf der Infektion mit Ausheilung HBsAg (Frösner et al., 1982) und HBeAg innerhalb von wenigen Wochen aus dem Serum eliminiert werden, bietet die Persistenz von HBeAg einen Hinweis für den Übergang der Erkrankung in eine chronische Hepatitis (Nielsen et al., 1974; Eleftheriou et al., 1975; El Sheikh et al., 1975; Magnusius et al., 1975; Takahashi et al., 1976b)

#### I.4: Aufbau des Hepatitis-B-Virus:

Das Virus ist ein sphärisches Partikel mit einem Durchmesser von 42 nm (Dane et al., 1970; Almeida, 1978) und wird nach seinem Entdecker auch Dane-Partikel genannt. Es kann aus dem Serum von akut Erkrankten und von chronischen HBV-Trägern isoliert werden (Ohori et al., 1984; Robinson and Greenman, 1974; Magnusius and Espmark, 1972).

Das Oberflächenantigen (HBsAg) (Blumberg, 1977) umgibt das sogenannte Core, das einen Durchmesser von 27 nm hat (Stannard and Hodgkiss, 1979). Dieses Core wird von dem zweiten bekannten Strukturprotein des HBV, dem Hepatitis-B-Core-Antigen (HBcAg) gebildet (Budkowska et al., 1977; Hruska and Robinson, 1977).

Im Inneren des Virus liegt die ringförmig aufgebaute DNA, bestehend aus 3200 Nucleotiden, einem kompletten "L"-(long)-Strang und einem inkompletten "S"-(short)-Strang, die, wie Abbildung 2 zeigt, neben den beiden Strukturantigenen auch noch für eine DNA-Polymerase und ein sogenanntes Protein X kodiert (Hruska et al., 1977).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus des HBV-Genoms:

(Modifiziert nach Tiollais et al., 1981)

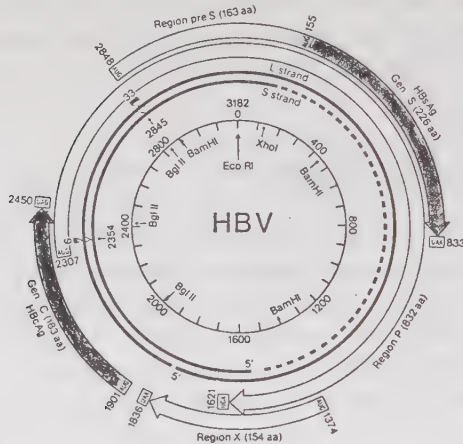


Diagramm der beiden Nucleinsäurestränge (L und S) und der durch sie kodierten Leseraster. Durch offene Pfeile sind die jeweiligen Proteine markiert. Die beiden bekannten Strukturantigene (HBsAg und HBeAg) sind herausgehoben. Die Nucleinsäuresequenz, die für HBcAg kodiert, reicht von Nucleotid 1901 bis 2348.

### I.5: Virusproteine:

#### I.5.1: Hepatitis-B-Oberflächen (surface) -Antigen (HBsAg):

Dieses Protein besteht nach der DNA-Sequenz aus 226 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 25000 D (Valenzuela et al., 1979; Tiollais and Wain-Hobson, 1984). Es zeigt eine starke Tendenz zur Dimerisierung, wobei die Dimerstruktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird. Von den beiden das Dimer bildenden Proteinen ist normalerweise nur eines glykosyliert (Chairez et al., 1973; Tiollais et al., 1981).

Entsprechend den Unterschieden in der DNA-Sequenz (Valenzuela et al., 1979) kann das HBV-Genom in 4 Subtypen eingeteilt werden (Tiollais und Wain-Hobson, 1984), die durch Antigenunterschiede des HBsAg

nachgewiesen werden können (Couroucé et al., 1976). So tragen alle Subtypen des HBsAg die Gruppendeterminante a (Mazzur et al., 1974) und alternativ je einen Vertreter der Subdeterminantenpaare d und y, sowie r und w. Beide Paare schließen sich gewöhnlich aus und verhalten sich deshalb in diesen Fällen wie Allele. Deshalb wurden folgende HBsAg-Subtypen beschrieben:

|     |                         |
|-----|-------------------------|
| adw | (Ono et al., 1983)      |
| adr | (Ono et al., 1983)      |
| ayw | (Galibert et al., 1979) |
| ayr | (Couroucé et al., 1976) |

In seltenen Fällen, die besonders im Fernen Osten auftraten, wurden vereinzelt ungewöhnliche HBsAg-Subtypenkombinationen beobachtet. Dies waren awr, adwr, adyr, adywr und adyw (Purcell and Gerin, 1975; Pasek et al., 1979).

Mit Antikörpern, die durch Immunisieren mit synthetischen Peptiden erzeugt wurden, die bestimmten Abschnitten der HBsAg-Sequenz entsprechen, können die d und y Determinanten unterschieden werden (Lerner et al., 1981; Bhatnagar et al., 1982; Dreesman et al., 1982; Alexander and Lerner, 1984).

Krugman (Krugman and Giles, 1970; Krugman et al., 1970; Krugman et al., 1971) erreichte bereits 1970 durch Injektion von Seren, die HBsAg enthielten, Immunschutz vor einer Infektion mit HBV. Gegenwärtig wird der Impfschutz durch Immunisieren mit dem HBsAg erreicht, das aus menschlichem Serum chronischer Träger des HBsAg gereinigt oder durch "genetic engineering" in Hefezellen gewonnen wurde (Szmuness et al., 1980; Szmuness et al., 1981; Zachoval et al., 1981; Scolnick et al., 1984).

#### 1.5.2: Hepatitis-B-Core-Antigen (HBcAg) und Hepatitis-B-e-Antigen (HBeAg):

HBcAg ist ein Protein, das je nach HBsAg-Subtyp des Virus aus 183-185

Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von etwa 22300 D hat. Seine Nucleotid- und Aminosäuresequenz ist in Abbildung 3 wiedergegeben:

Abbildung 3: Aminosäuren- und Nucleotidsequenz des HBcAg:

HBsAg-Subtyp des Virus: adw.

(Nach Pasek et al., 1979; modifiziert nach Takahashi et al., 1983)

(Die Nummerierung bezeichnet die Aminosäuren entsprechend der Sequenz.)

```

1
MET ASP ILE ASP PRO TYR LYS GLU PHE GLY ALA SER VAL GLU LEU LEU SER PHE LEU PRO
ATG GAC ATT GAC CCT TAT AAA GAA TTT GGA GCT TCT GTG GAG TTA CTC TCG TTT TTG CCT

21
SER ASP PHE PHE PRO SER VAL ARG ASP LEU LEU ASP THR ALA SER ALA LEU TYR ARG GLU
TCT GAC TTC TTT CCT TCC GTA CGA GAT CTC CTA GAC ACC GCC TCA GCT CTG TAT CGA GAA

41
ALA LEU GLU SER PRO GLU HIS CYS SER PRO HIS HIS THR ALA LEU ARG GLN ALA ILE LEU
GCC TTA GAG TCT CCT GAG CAT TGC TCA CCT CAC CAT ACT GCA CTC AGG CAA GCC ATT CTC

61
CYS TRP GLY GLY LEU MET THR LEU ALA THR TRP VAL GLY ASN ASN LEU GLN ASP PRO ALA
TGC TGG GGG GGA TTG ATG ACT CTA GCT ACC TGG GTG GGT AAT AAT TTG CAA GAT CCA GCA

81
SER ARG ASP LEU VAL VAL ASN TYR VAL ASN THR ASN MET GLY LEU LYS ILE ARG GLN LEU
TCC AGA GAT CTA GTA GTC AAT TAT GTT AAT ACT AAC ATG GGT TTA AAG CTC AGG CAA CTA

101
LEU TRP PHE HIS ILE SER CYS LEU THR PHE GLY ARG GLU THR VAL LEU GLU TYR LEU VAL
TTG TGG TTT CAT ATA TCT TGC CTT ACT TTT GGA AGA GAG ACT GTA CTT GAA TAT TTG GTC

121
SER PHE GLY VAL TRP ILE ARG THR PRO PRO ALA TYR ARG PRO PRO ASN ALA PRO ILE LEU
TCT TTC GGA GTG TGG ATT CGC ACT CCT CCA GCC TAT AGA CCA CCA AAT GCC CCT ATC TTA

141      C-Terminus  HBcAg 150
SER THR LEU PRO GLU THR THR VAL VAL ARG ARG ARG ASP ARG GLY ARG SER PRO ARG ARG
TCA ACA CTT CCG GAA ACT ACT GTT GTT AGA CGA CCG GAC CGA GGC AGG TCC CCT AGA AGA

161
ARG THR PRO SER PRO ARG ARG ARG ARG SER GLN SER PRO ARG ARG ARG ARG SER GLN SER
AGA ACT CCC TCG CCT CGC AGA CGT AGA TCT CAA TCG CCG GGT CGC AGA AGA TCT CAA TCT

181
ARG GLU SER GLN CYS ***
CGG GAA TCT CAA TGT TAG
  
```

Darstellung der Nucleotidsequenz des HBcAg-Gens und Translation in die Aminosäuresequenz. HBcAg und HBeAg bestehen aus einer identischen Proteinkette bis zur Aminosäure 149. Der C-terminale Rest wird nur beim HBcAg gefunden.

Entsprechend der Nucleotidsequenz (Abbildung 3) besteht dieses Antigen aus einem N-terminalen stark hydrophoben Anteil und einem C-terminalen stark hydrophilen Rest (Abbildung 4) mit einem hohen Anteil an Argininresten (Pasek et al., 1979).

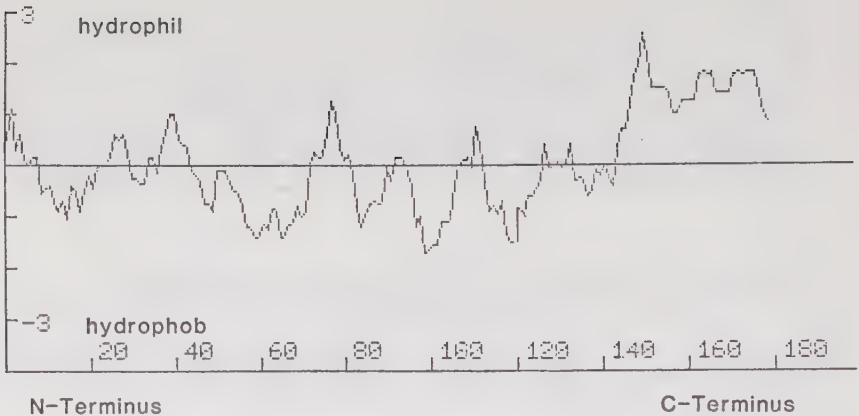
Wie der Abbildung 3 zu entnehmen ist, sind die ersten 149 Aminosäuren des HBcAg identisch mit denen des HBeAg. Während das HBeAg hier endet, besitzt das HBcAg darüberhinaus weitere 34 Aminosäuren (bzw. 36 beim HBsAg-Subtyp des Virus: adw) mit einem hohen Anteil von Argininresten, weshalb HBcAg von Tiollais et al. (1981) mit Protamin verglichen wurde.

Abbildung 4: Berechnung der mittleren Hydrophobie des HBcAg:  
HBsAg-Subtyp des Virus: adw.

Folgende Werte für die relative Hydrophobie der einzelnen Aminosäuren bildeten die Grundlage für die Graphik:

|               |               |
|---------------|---------------|
| 1. ARG= 3,0   | 2. ASP= 3,0   |
| 3. GLU= 3,0   | 4. LYS= 3,0   |
| 5. SER= 0,3   | 6. ASN= 0,2   |
| 7. GLN= 0,2   | 8. GLY= 0,0   |
| 9. PRO= 0,0   | 10. THR= -0,4 |
| 11. ALA= -0,5 | 12. HIS= -0,5 |
| 13. CYS= -1,0 | 14. MET= -1,3 |
| 15. VAL= -1,5 | 16. ILE= -1,8 |
| 17. LEU= -1,8 | 18. TYR= -2,3 |
| 19. PHE= -2,5 | 20. TRP= -3,4 |

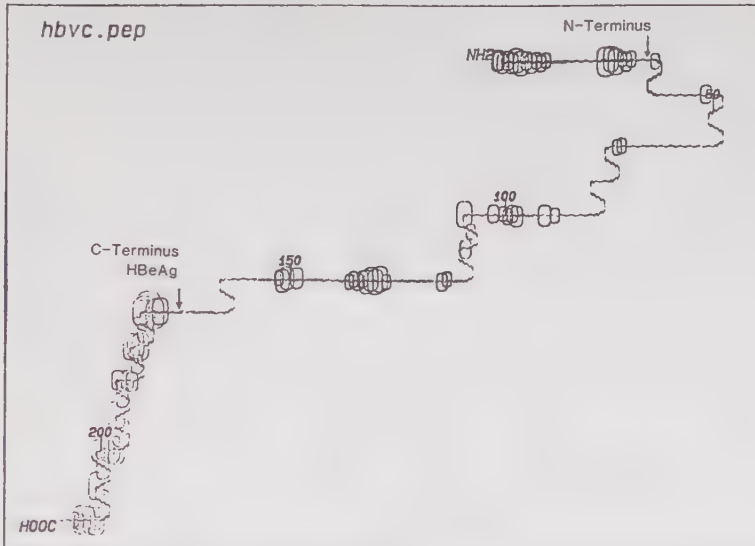
Der laufende Durchschnitt wurde über 7 Aminosäuren berechnet. Die Berechnung wurde an einem Apple II-Computer durchgeführt, das verwendete Rechnerprogramm stammte von R. Larrson und J. Messing, University of Minnesota.



Die Verteilung hydrophober und hydrophiler Aminosäuren der Primärstruktur des HbC Ag läßt einen mäßig hydrophoben Aminoterminus (Aminosäuren 1 - 149) und einen stark hydrophilen Carboxyterminus erkennen (Aminosäuren 150 - 185).

Diese Verteilung der Ladungen beeinflußt Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des Antigens. Abbildung 5 zeigt die Sekundärstruktur des HbC Ag, wie sie durch die Anwendung der Methode von Chou und Fasman (Chou und Fasman, 1974 a und b; 1978) zur Bestimmung der Sekundärstruktur durch einen Computer ermittelt wurde (Cohen et al., 1984). (Das verwendete Rechnerprogramm wurde von Prof. Hans Wolf, Max von Pettenkofer-Institut entwickelt. Bei der graphischen Darstellung der Struktur half Frau Dr. Susanne Modrow.)

Abbildung 5: Sekundärstruktur von HBcAg, berechnet nach der Methode von Chou und Fasman:  
HBsAg-Subtyp des Virus: adw.



Graphische Darstellung der Sekundärstruktur von HBcAg durch Berechnung nach der Methode von Chow und Fasman. Unterschieden werden helikale () , sowie faltblattstrukturen () und  $\beta$ -Turns () . Disulfidbrücken, wie sie durch die Reaktion von Cysteinresten entstehen, wurden nicht berücksichtigt. Hydrophile und hydrophobe Regionen sind hervorgehoben. (Hydrophil:  ; Hydrophob: )

Durch Behandlung mit 2,5 M CsCl können aus Corepartikeln HBcAg und HBeAg dissoziiert werden (Ohuri et al., 1984), durch Behandlung des HBc-Antigens mit SDS und 2-Mercaptoäthanol wird die HBc-Antigenität zerstört, und die neuaufgetretene HBe-Antigenität kann nachgewiesen werden (Mackay et al., 1981). Ebenso wird durch Behandlung mit Ultraschall oder Kaliumthiocyanat eine Umwandlung von HBcAg in HBeAg beobachtet (Ohuri et al., 1980). Nach Behandlung des HBcAg mit SDS und Pronase konnten zwei verschiedene HBe-Antigenitäten entdeckt werden (Budkowska et al., 1979; Takahashi et al., 1981), beide zeigen ein

unterschiedliches Dissoziationsverhalten von Dane-partikeln (Otori et al., 1984).

HBeAg wurde von Magnus und Espmark 1972 durch Anwendung der Doppeldiffusionstechnik nach Ouchterlony (Ouchterlony et al., 1958) in Seren von Patienten mit akuter und chronischer Hepatitis-B-Infektion entdeckt. Dabei konnten drei Präzipitationslinien identifiziert werden (Tedder, 1978; Blanchy et al., 1980; Pillot and Capel, 1980), welche durch die Antigene  $e_1$ ,  $e_2$  und  $e_3$  hervorgerufen wurden (Williams and LeBouvier, 1976; Murphy et al., 1978; Trepo et al., 1978).

Aufgrund der Komplexbildung mit anderen Proteinen hat die Isolierung von HBeAg aus Serum immer Schwierigkeiten gemacht (Tedder and Bull, 1979; Ferns and Tedder, 1984). HBeAg hat ein starkes Haftvermögen an IgG (Takahashi et al., 1977; Neurath und Strick, 1977) sowie an andere Proteine und Lipide (Budkowska et al., 1984). HBeAg allein und in Gegenwart von Immunglobulinen zeigt bei längerem Aufbewahren autolytische Spaltung, wobei aus dem Protein mit dem Molekulargewicht von 20600 D Bruchstücke mit Molekulargewichten von 14700 D und 6000 D freigesetzt werden (Albin and Robinson, 1980).

Die erste Reindarstellung von HBeAg aus Serum gelang Takahashi et al. (1983) durch Affinitätschromatographie an monoklonalen Antikörpern gegen HBeAg, Gelfiltration und präparative SDS-Gelelektrophorese. Dieses Protein hatte ein Molekulargewicht von 15500 D und ein C-terminales Ende mit der Aminosäuresequenz Thr-Thr-Val-Val. Budkowska et al. (1984) isolierten HBeAg aus Leberzellen durch CsCl-Gradientenzentrifugation und Gelfiltration. Dieses Protein zeigte, abhängig von der Elutionsmethode (Kochsalz oder Thiocyanat), ein Molekulargewicht von 45000 bzw. 40000 D.

#### I.6: Nachweis von HBV-Proteinen:

Während der Nachweis von HBsAg und HBeAg mit immunologischen Methoden keine Schwierigkeiten bereitet, da Seren ausschließlich mit anti-HBs- bzw. anti-HBe-Aktivität zur Verfügung stehen, bereitet der Nachweis von HBeAg Probleme, da bisher kein Serum mit Antikörpern nur gegen HBeAg gefunden werden konnte. Dies liegt zum einen daran, daß das von der Wirtszelle synthetisierte HBeAg im Körper teilweise zu HBeAg

umgewandelt wird, zum anderen an der höheren Immunogenität des HBcAg. Der diagnostische Nachweis von HBeAg in Patientenserum stellt insofern kein Problem dar, als davon ausgegangen werden kann, daß in Gegenwart hoher Titer von anti-HBc freies HBcAg im Serum durch entsprechende Antikörper nicht nachgewiesen werden kann. Werden aber im Verlauf einer Reinigung Antigen-Antikörperkomplexe aufgelöst, dann muß sichergestellt sein, daß HBcAg nicht mit HBeAg interferiert. Dies kann zum einen dadurch erreicht werden, daß durch Ultrazentrifugation partikuläre Bestandteile sowie Immunkomplexe abgetrennt werden, zum anderen dadurch, daß bei den entsprechenden Reinigungsschritten neben dem HBeAg-Test ein Test auf das Vorhandensein von HBcAg durchgeführt wird. Aufbau und Wirkungsweise der angewandten Testmethoden sind im Abschnitt "Methoden" dargestellt.

#### I.7: Aufgabenstellung:

Das Vorhandensein von HBeAg im Serum hat erhebliche Bedeutung bei der Prognose des Verlaufs einer akuten Hepatitis B (Eleftheriou et al., 1975; El Sheikh et al., 1975; Magnus et al., 1975; Nielsen et al., 1974) und erlaubt einen Rückschluß auf die Infektiosität des Serums (Alter et al., 1976; Imai et al., 1976; Werner et al., 1977). Bei Patienten, die an einer chronischen Hepatitis B leiden, beruht eine kontinuierliche Ausschwemmung des HBeAg ins Serum wahrscheinlich auf einer ständigen Virusvermehrung. Nach Shafritz wird dabei im Gegensatz zum primären hepatozellulären Karzinom die Virus-DNA nicht in das Genom der menschlichen Leberzelle eingebaut (Shafritz et al., 1981). Ob das HBeAg nur zufällig im Überschuß produziert wird oder durch einen hemmenden Einfluß auf die Körperabwehr zur Chronizität der Erkrankung beiträgt, ist eine offene Frage, die bei Vorhandensein von genügend reinem HBeAg beantwortet werden kann.

Da die bisher etablierten monoklonalen Antikörper gegen HBeAg (Imai et al., 1982; Takahashi et al., 1983; Ferns and Tedder, 1984) nicht allgemein zur Verfügung stehen und überdies eine sehr geringe Affinität haben, war es Ziel dieser Arbeit, einen Weg zur Reindarstellung des HBeAg aus Plasma zu finden, der unabhängig von monoklonalen Antikörpern ist und mit den üblichen Labormethoden durchgeführt werden kann.

II: Material:II.1: Abkürzungen:II.1.1: Biologisches Material:

|          |                                           |
|----------|-------------------------------------------|
| HBV      | Hepatitis-B-Virus                         |
| HBsAg    | Hepatitis-B-Oberflächen (surface)-Antigen |
| HBcAg    | Hepatitis-B-Kern (core)-Antigen           |
| HBeAg    | Hepatitis-B-e-Antigen                     |
| anti-HBs | Antikörper gegen HBsAg                    |
| anti-HBc | Antikörper gegen HBcAg                    |
| anti-HBe | Antikörper gegen HBeAg                    |
| Delta-Ag | Delta-Antigen                             |
| HAV      | Hepatitis-A-Virus                         |
| anti-HAV | Antikörper gegen HAV                      |
| IgG      | Immunglobulin G                           |
| IgM      | Immunglobulin M                           |

II.1.2: Reagentien:

|           |                                                               |
|-----------|---------------------------------------------------------------|
| AMPER     | Ammoniumperoxodisulfat                                        |
| BSA       | Rinderserumalbumin                                            |
| DATD      | N,N'-Diallyltartardiamid                                      |
| DEAE      | Diäthylaminoäthyl-                                            |
| NP 40     | Nonidet P 40                                                  |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat                                          |
| TCA       | Trichloressigsäure                                            |
| TEMED     | N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin                            |
| TRIS pH x | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, mit HCl auf pH x eingestellt |

II.1.3: Einheiten:

|     |                                                                        |
|-----|------------------------------------------------------------------------|
| A   | Ampère                                                                 |
| °C  | Grad Celsius                                                           |
| Ci  | Curie                                                                  |
| cpm | gezählte Zerfälle pro Minute                                           |
| D   | Dalton                                                                 |
| g   | Gramm                                                                  |
| G   | Schwerkraft                                                            |
| h   | Stunde                                                                 |
| l   | Liter                                                                  |
| m   | Meter                                                                  |
| M   | Mol                                                                    |
| min | Minuten                                                                |
| pH  | Negativer dekadischer Logarithmus der<br>Wasserstoffionenkonzentration |
| rpm | Umdrehungen pro Minute                                                 |
| V   | Volt                                                                   |
| W   | Watt                                                                   |
| w/v | Gewichtsanteile pro Volumen                                            |

II.1.4: Sonstiges:

|                 |                                                                                                                              |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ag              | Antigen                                                                                                                      |
| DNA             | Desoxyribonucleinsäure                                                                                                       |
| ICS             | Immune Chemistry System; halbautomatisches<br>nephelometrisches Verfahren zur quantitativen<br>Bestimmung von Serumproteinen |
| IEF             | Isoelektrische Fokussierung                                                                                                  |
| NEPHGE          | Non-equilibrium-pH-gradient-gel-electrophoresis                                                                              |
| OD <sub>x</sub> | Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm                                                                               |
| PAGE            | Polyacrylamidgelelektrophorese                                                                                               |
| pI              | Isoelektrischer Punkt                                                                                                        |
| RIA             | Radioimmunoassay                                                                                                             |

Brüche und Exponenten wurden mit den in den SI-Regeln festgelegten Abkürzungen bezeichnet.

## II.2: Nachweis von HBV-Markern:

Zum Nachweis der HBV-Marker wurden die Radioimmunassays der Firma Abbott Laboratories, North Chicago, Illinois verwendet. Im Einzelnen waren das:

- AUSRIA II zum Nachweis von HBsAg
- AUSAB zum Nachweis von anti-HBs und der Subtypen des HBsAg
- HBeAG-RIA zum Nachweis von HBeAg
- CORAB zum Nachweis von anti-HBc

## II.3: Quantitative Bestimmung von Albumin und IgG:

Albumin und Immunglobulin G wurden mit Hilfe der entsprechenden ICS-Kits der Firma Beckman Laboratories, Irvine, Calif., USA quantitativ bestimmt.

## II.4: Chemikalien und andere Materialien:

Alle Chemikalien wurden in der höchsten käuflichen Reinheitsstufe benutzt.

Folgende Chemikalien wurden von den aufgeführten Firmen bezogen:

Amersham-Buchler, Braunschweig:

(Methyl-<sup>3</sup>H) Thymidin 5'-triphosphat, Ammoniumsalz; 40 - 60 Ci/mmol.

Amicon, Witten:

Ultrafiltrationsmembran YM 2.

J.T. Baker Chemical Co, Philipsburg, NJ, U.S.A.:

Äthanol absolut; Methanol.

BioRad Laboratories, München:

SDS-PAGE Protein Standards; DATD; Biogel P-6DG; Biogel P 150; Natriumdodecylsulfat (SDS).

BRL, Bethesda Research Laboratories, Eggenstein:  
Acrylamid; Prestained Protein Standards; Urea ultrapure.

Merck, Darmstadt:

Äthylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz (EDTA); Ameisensäure 100%;  
Ammoniak 32%; Ammoniumsulfat; Calciumchlorid  $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ ; Citronensäure;  
Cyanogenbromid; Essigsäure; Formaldehyd 37%; Glutardialdehyd 25%;  
Glycerin; Glycin; Isopropanol; Kaliumchlorid; Kaliumhydroxid;  
Kaliumdihydrogenphosphat; Kaliumhexacyanoferrat(III); Magnesiumchlorid  
 $\times 6 \text{ H}_2\text{O}$ ; Natriumchlorid; di-Natriumhydrogenphosphat; Natriumhydroxid;  
Natriumthiosulfat; Saccharose; Salzsäure 37%; Silbernitrat;  
Trichloressigsäure; Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS).

Pharmacia, Freiburg:

Sephacryl S 200; Sephadex IEF; Phenylsepharose; Pharmalyte  
(pH-Bereiche 3 - 10 und 4 - 6,5).

Reichelt Chemietechnik, Heidelberg:

Dialyseschlauch Nr. 53301, Ausschlußgrenze 1000 D.

SERVA, Heidelberg:

Ammoniumperoxodisulfat (AMPER).

SIGMA Chemie, München:

Agarose; Ammoniumbicarbonat; Bromphenolblau; Coomassie Brilliant Blue R  
250; 2'-Deoxyadenosin 5'-triphosphat, Dinatriumsalz; 2'-Deoxycytidin  
5'-triphosphat, Natriumsalz; 2'-Deoxyguanosin 5'-triphosphat, Trissalz;  
2-Mercaptoäthanol; NP 40.

Whatman Ltd., Springfield Mill. Maidstone, Kent, England:

Papiere 3MM, 1MM.

## II.5: Antigenquelle:

Als Ausgangsmaterial zur Reinigung von HBeAg diente das Plasma eines Patienten mit einer chronisch-persistierenden Hepatitis B und Hämochromatose. Die Diagnose wurde histologisch durch eine Leberbiopsie gesichert, die darüber hinaus eine feinknotige Leberzirrhose zeigte. Zur Therapie der Hämochromatose wurden dem Patienten im Abstand von 3 - 5 Wochen jeweils ca. 400 ml Blut entnommen. Insgesamt standen ca. 2000 ml Plasma zur Verfügung.

Aus menschlicher Leber gereinigtes HBcAg war ein Geschenk von Dr. med. habil. M. Roggendorf. Dieses Material wurde durch fraktionierte Zentrifugation gewonnen.

## II.6: Antiserum:

Für den immunologischen Nachweis von HBcAg (siehe III.3) diente das Plasma eines gesunden Trägers des HBsAg. Dieses Antiserum hatte einen Antikörpertiter gegen HBeAg von 1:5000 und gegen HBcAg von 1:15000. Das  $^{125}\text{J}$  - markierte anti-HBc wurde dem CORAB-Testkit entnommen und war frei von anti-HBe (nachgewiesen durch fehlende Reaktion mit HBeAg).

## II.7: Puffer und Lösungen:

### 1. Elutionspuffer für das Gewinnen von Proteinen aus Polyacrylamidgelen:

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Ammoniumbicarbonat | 50 mM |
| EDTA               | 50 mM |
| SDS                | 0,1 % |

### 2. TRIS-Kochsalzpuffer (TN):

|      |           |
|------|-----------|
| TRIS | 10 mM     |
| NaCl | 150 mM    |
| HCl  | ad pH 7,4 |

3. Kaliumphosphatpuffer pH 8,0 zum Äquilibrieren und Spülen der Phenylsepharose-Säule:

Kaliumdihydrogenphosphat 20mM  
eingestellt mit 6M KOH

4. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS):  
wie beschrieben von Dulbecco und Vogt, 1954:

|                                            |           |
|--------------------------------------------|-----------|
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 132,5 mg  |
| KCl                                        | 200,0 mg  |
| $\text{KH}_2\text{PO}_4$                   | 200,0 mg  |
| $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 100,0 mg  |
| NaCl                                       | 8,0 g     |
| $\text{Na}_2\text{HPO}_4$                  | 1150,0 mg |
| $\text{H}_2\text{O}$                       | ad 1 l    |

5. Elektrophoresepuffer 10x konzentriert (Elpho 10), als Kammerpuffer für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

|                      |        |
|----------------------|--------|
| TRIS                 | 30 g   |
| Glycin               | 144 g  |
| SDS                  | 10 g   |
| $\text{H}_2\text{O}$ | ad 1 l |

6. SDS-Probenpuffer 4x konzentriert, zur Anlagerung von SDS und zur Reduktion der Cystin-Brücken der zu trennenden Proteine:

|                     |        |
|---------------------|--------|
| TRIS-HCl pH 7,0, 1M | 9,6 ml |
| SDS, 20%            | 0,4 ml |
| in Saccharose, 30 % |        |
| Bromphenolblau      | 50 mg  |
| 2-ME                | 0,5 ml |

7. IEF-Probenpuffer, zur Vorbereitung der Proteinproben für die isoelektrische Fokussierung:

wie beschrieben von Anderson and Anderson, 1977.

Modifiziert nach Jones, 1980.

|                     |      |
|---------------------|------|
| Harnstoff           | 8 M  |
| NP 40               | 2,0% |
| Pharmalyte pH 4-6,5 | 1,6% |
| Pharmalyte pH 3-10  | 0,4% |
| 2-ME                | 5,0% |

8. IEF-Gellösung, zum Gießen der Acrylamidgele für die isoelektrische Fokussierung:

Wie beschrieben von Anderson and Anderson, 1977.

Modifiziert nach Jones, 1980.

|                        |         |
|------------------------|---------|
| Harnstoff              | 8,25 g  |
| Acrylamid (30%) /      |         |
| Bisacrylamid (1,8%)    | 0,66 ml |
| Pharmalyte, pH 3 - 10  | 200 µl  |
| Pharmalyte, pH 4 - 6,5 | 50 µl   |
| NP 40 (10%)            | 100 µl  |
| AMPER (10%)            | 10 µl   |
| TEMED                  | 7 µl    |
| H <sub>2</sub> O       | ad 5 ml |

### III: Methoden:

#### III.1: Nachweis des HBeAg mit Hilfe eines Radioimmuntests:

HBeAg wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Radioimmuntests (RIA) bestimmt (Frösner et al., 1978; Mushahwar et al., 1978). Es handelt sich hierbei um einen Festphasen-Radioimmuntest, der nach dem "Sandwichprinzip" aufgebaut ist. Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf eines solchen Testansatzes für eine positive und eine negative Probe.

Polystyrolkugeln, die mit menschlichem anti-HBe und anti-HBc beschichtet waren, wurden mit den Serumproben (200 µl) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um in der Probe vorhandenes HBeAg zu binden. Durch dreimaliges Waschen der Kugel mit jeweils 5 ml destilliertem Wasser wurden nicht gebundene Bestandteile der Proben entfernt.

Während einer zweiten Inkubationsphase reagierten mit  $^{125}\text{Jod}$  markierte Antikörper eines Plasmas, das anti-HBe und anti-HBc enthielt, mit dem gebundenen HBeAg. Nach fünffachem Waschen mit destilliertem Wasser wurde die Menge der gebundenen Radioaktivität in einem Gamma-Zähler (Nuclear Enterprises, Glasgow) während einer Minute Zählzeit bestimmt. Da freies HBcAg in menschlichen Seren nicht vorkommt, wird mit der beschriebenen Methode nur das vorhandene HBeAg erfaßt. Eine weitere Spezifitätsreaktion ist damit in der Diagnostik entbehrlich.

Bei jedem Testansatz wurden drei Positiv- und drei Negativkontrollen (Plasmen, die HBeAg enthielten bzw. frei von Hepatitis-B-Markern waren) mitgeführt. Zur Unterscheidung von positiven und negativen Ergebnissen diente der "cut off"-Wert. Durch eine entsprechende Festlegung dieser empirischen Grenze wurden die Einflüsse unspezifisch gebundener Proteine und von Störfaktoren, die durch die radioaktive Markierung des Antikörpers auftreten können, weitgehend eliminiert. Der "cut off"-Wert entsprach der 2,1-fachen Zählrate des Mittelwertes der drei Ansätze der Negativkontrolle. Weder bei dem verwendeten noch bei anderen käuflichen Testkits zur Bestimmung von HBeAg sind aufgrund des Fehlens von gereinigtem HBeAg Angaben über die erfaßten Antigenmengen möglich. Experimentell gesichert können über einen als "Sandwichtest" aufgebauten RIA dieser Art je nach Antigen minimale Mengen von 0,1 - 1 ng Protein nachgewiesen werden (Butler, 1980).

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Sandwichtests zum Nachweis von HBeAg im Serum:



Polystyrolkugeln (○) werden mit antikörperhaltigem Serum oder Plasma beschichtet (Antikörper  $\gamma$ ). Die gebundenen Antikörper können über den Fab-Teil mit ihrem korrespondierenden Antigen reagieren (1. Inkubation). Das gebundene Antigen kann in einem zweiten Reaktionsschritt mit einem radioaktiv markierten Antikörper ( $\gamma^*$ ) theoretisch quantitativ bestimmt werden. Da zur Bestimmung von HBeAg kein Antiserum zur Verfügung steht, das nur anti-HBe enthält, muß sichergestellt sein, daß kein freies HBeAg in der Probe vorhanden ist.

Wie auf Seite 60 beschrieben, kann mit dem in dieser Arbeit gereinigten HBeAg die Nachweisempfindlichkeit mit etwa 0,2 ng errechnet werden. Proben, die weniger als 0,2 ng HBeAg enthalten, werden mit diesem Test nicht erfaßt. Die Positivkontrolle des Testkits bestand aus vorgereinigtem Plasma, dessen HBeAg-Gehalt nach eigenen Rückrechnungen (siehe Seite 60) ca. 20 ng HBeAg pro ml betrug. Der HBeAg-Gehalt der Positivkontrolle war so eingestellt, daß die gemessenen cpm mindestens den 5-fachen Wert der Negativkontrolle erreichten. Dadurch konnten sowohl der Ablauf der Antigen-Antikörper-Bindungsreaktionen unter den gewählten Testbedingungen, als auch der verwendete radioaktiv markierte Antikörper beurteilt werden.

### III.2: Bestimmung des HBeAg-Titers und Quantifizierung:

In Plastikröhrchen (1 x 5 cm) wurden 450 µl Verdünnungslösung (9 Teile 0.9 % NaCl und 1 Teil menschliches Serum ohne HBV-Marker) und 50 µl zu testendes Serum pipettiert. Nach dem Mischen wurde von dieser 1:10 Verdünnung in gleicher Weise weiterverdünnt, bis die zu erwartende Endtiterstufe um 2 Stufen überschritten war. Als Endtiterstufe galt die letzte Verdünnungsstufe, bei der die Zählrate im HBeAg-Test noch über dem "cut off"-Wert lag. Als Titer wurde der letzte positive Verdünnungswert angegeben.

Die gemessenen cpm wurden um die cpm der nicht weiter verdünnten Negativkontrolle reduziert, und die gebundene Radioaktivität ( $\text{cpm} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ ) als Maß für die vorhandene HBeAg-Menge verwendet (Berechnung siehe Ergebnisse). Die Verdünnung der Negativkontrollen führte zu keiner weiteren Verminderung der Zählrate (siehe Seite 42, Tabelle 5 ).

### III.3: Nachweis des HBcAg mit Hilfe eines Radioimmuntests:

HBcAg wurde nach dem gleichen Testprinzip, wie für HBeAg beschrieben, durchgeführt. Die Testkugeln waren mit dem identischen Testserum beschichtet, die Inkubationszeiten entsprachen denen des HBeAg-Tests. Als Quelle für die radioaktiv-markierten Antikörper diente in diesem Fall ein Plasma, das nur anti-HBc aber kein anti-HBe enthielt. Dadurch

konnte HBcAg nachgewiesen werden, ohne daß HBeAg miterfaßt wurde. Dieser Testansatz diente gleichzeitig als Kontrolle für die Spezifität des HBeAg-Nachweises, da die dort verwendeten Plasmen zum Beschichten der Polystyrolkugeln und zur Herstellung der radioaktiv markierten Antikörper anti-HBc neben anti-HBe enthielten. Es mußte also ausgeschlossen werden, daß ein positives Ergebnis im HBeAg-RIA durch das Vorhandensein von HBcAg hervorgerufen wurde.

#### III.4: Nachweis der HBV-spezifischen DNA-Polymerase:

Der Nachweis der HBV-spezifischen DNA-Polymerase wurde wie bei Howard (1978) beschrieben durchgeführt. Dazu wurden 2,5 ml Plasma 1:2 in TN-Puffer verdünnt und während 4 h bei 100 000 G zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben und das Pellet in 250 µl TN-Puffer suspendiert. Aliquots von 50 µl wurden in den Test eingesetzt. Die Reaktion lief in Tris-Puffer bei 37 ° C während 6h ab. Die Menge des eingebauten <sup>3</sup>H-dTTP wurde nach Fällung mit 5% Trichloressigsäure im Betazähler gemessen.

#### III.5: Nachweis von HBsAg, Delta-Ag, anti-HBc und anti-HAV:

Der Nachweis dieser Hepatitismarker wurde in der Hepatitisdiagnostikabteilung des Max von Pettenkofer-Instituts mit den dort üblichen immunologischen Testverfahren durchgeführt.

#### III.6: Nachweis von IgG-Antikörpern gegen andere DNA-Viren:

Die Testung des zur Reinigung von HBeAg verwendeten Serums auf gegen andere DNA-Viren gerichtete IgG-Antikörper wurde im Virusdiagnostischen Laboratorium des Max von Pettenkofer-Instituts mit den dort üblichen Testverfahren durchgeführt.

### III.7: Bestimmung des Proteingehalts in Lösungen:

#### 1. Messung der Absorption bei 280 nm und 260 nm:

Die Proben wurden in Mikroküvetten (Lichtweg 1 cm) in einem Beckman Spektralphotometer (Model 24 Beckman, Illinois) gegen den entsprechenden Leerwert gemessen. Der Proteingehalt (c) wurde durch die Extinktionsdifferenz zwischen den Meßwerten bei den Wellenlängen 280 nm und 260 nm mit Hilfe der Warburgschen Formel (Warburg, 1948) berechnet:

$$(c) = 1.55 \times OD_{280} - 0.76 \times OD_{260}$$

#### 2. Bestimmung des Proteingehalts nach der Anfärbarkeit mit Silbernitrat (halbquantitativ) im Vergleich zur Färbeintensität der Eichproteine (Oakley et al., 1980; Poehling und Neuhoff, 1981; Merrill et al., 1982):

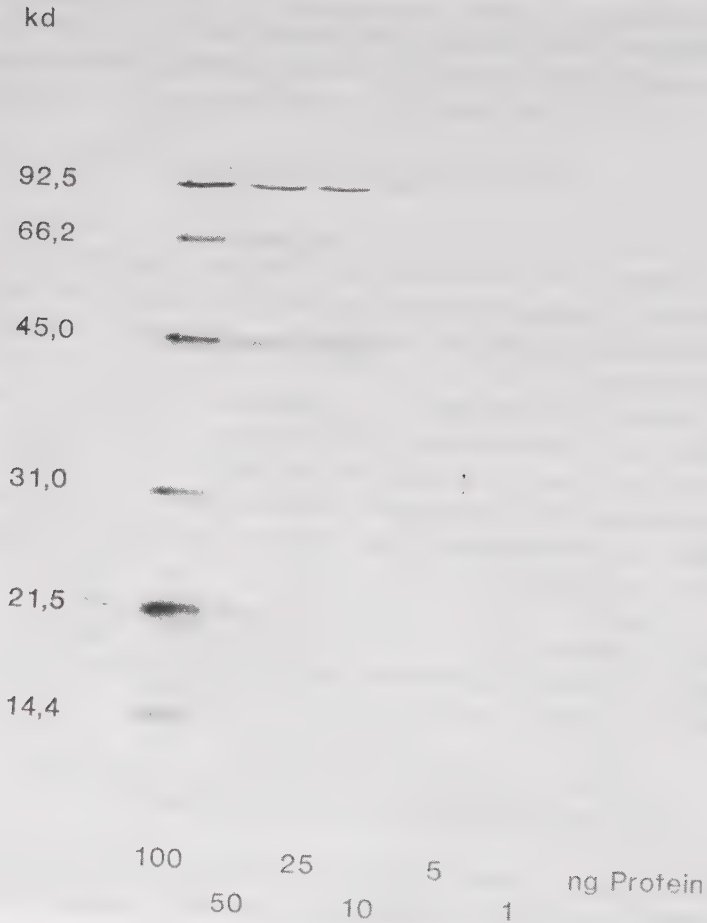
Dazu wurden Proteingemische mit bekannter Konzentration durch Elektrophorese aufgetrennt und mit Silber angefärbt. Die Intensität der Anfärbung der Probe wurde visuell mit der Intensität der Anfärbarkeit der Referenzproteine in Beziehung gebracht (Merrill et al., 1982). Hierdurch war eine halbquantitative Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben möglich.

In Abbildung 7 ist dargestellt, welchen Einfluß die Proteinkonzentration von Markerproteinen auf die Intensität der Silberfärbung hat. Probenproteinkonzentrationen wurden im Vergleich hierzu halbquantitativ bestimmt.

### III.8: Quantitative Bestimmung von Immunglobulin G und Albumin aus menschlichen Seren:

IgG und Albumin wurden mit Hilfe eines Beckman Nephelometers (ICS Analyzer II) quantitativ bestimmt (Layne, 1957; Sternberg, 1977; Träxler, 1979). Dabei werden durch Zugabe von Antikörpern zum Plasma Komplexe gebildet, die zu einer Trübung führen. Diese kann mittels polarisierten Lichtes quantifiziert werden.

Abbildung 7: Korrelation von Proteinmenge und Färbeintensität von Markerproteinen im SDS-PAGE bei der Silberfärbung:



SDS-PAGE eines Proteinstandardgemischs aus Phosphorylase B, BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor und Lysozym. Die Mengenangaben sind nach den Daten des Herstellers berechnet.

### III.9: Reinigung des HBeAg aus Plasma:

#### III.9.1: Entfernen von Detritus und Dane-Partikeln aus menschlichem Plasma:

Um grobe Partikel zu entfernen, wurde das Plasma bei 4°C und 6000 G 30 min zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde anschließend einer Ultrazentrifugation (Rotor SW27, 100000 G, 4 h oder 60000 G, 16 h) unterworfen (Howard, 1978).

Der Überstand wurde abgehoben und das Sediment in 250 µl TN-Puffer (10mM TRIS-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl) resuspendiert. Das Sediment diente als Ausgangsprodukt für die Reinigung von Dane-Partikeln (Robinson und Greenman, 1974; Takahashi et al., 1976a; Landers et al., 1977), während aus dem Überstand das HBeAg gereinigt wurde.

#### III.9.2: Ammoniumsulfatpräzipitation:

Proteine binden in wässriger Lösung Wassermoleküle in Form einer Hydrathülle von 30 - 50% ihres Eigengewichts (Keil und Sormova, 1965). Durch Zusatz von Ammoniumsulfat (Green and Hughes, 1955) wird die Hydrathülle der Proteine reduziert, bis diese aus der Lösung ausfallen (Dixon and Webb, 1961).

Im Eisbad wurden 100 ml partikelfreies Plasma mit der gleichen Menge einer eisgekühlten, gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat in TN-Puffer versetzt, die Suspension in der Kälte 30 min gerührt und anschließend 45 min bei 4°C zentrifugiert (Sorvall Superspeed Zentrifuge, Rotor GSA, 8 000 G) (Baranowski und Niederland, 1949; Green and Cori, 1943).

Der Überstand, der kein HBeAg enthielt, wurde entfernt, das Präzipitat in 50% des ursprünglichen Volumens von TN-Puffer gelöst. Nach Kühlung im Eisbad wurde ein entsprechendes Volumen einer kaltgesättigten Ammoniumsulfatlösung zugefügt, um eine 50%-ige Sättigung zu erreichen. Nach erneuter Zentrifugation wurde dieser Schritt wiederholt.

### III.9.3: Dialyse gegen destilliertes Wasser:

Um die unspezifische Proteinadsorption zu vermindern, wurde der verwendete Dialyseschlauch vor der Dialyse 10 min in 50 mM EDTA-Lösung gekocht und anschließend 2 h in destilliertem Wasser gründlich gewaschen.

Die präzipitierten Proteine wurden in 50 ml Wasser gelöst und zum Entfernen des Salzes gegen destilliertes Wasser dialysiert (72 h, 4°C, zehnmaliger Wasseraustausch).

Zur weiteren Reinigung wurde die salzfreie Proteinsuspension bei 6 000 G und 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgetrennt und mit festem Ammoniumsulfat bis zur 25%-igen Sättigung versetzt.

### III.9.4: Chromatographie an Phenylsepharose:

Proteine tragen im nativen Zustand, bedingt durch die Konformation, hydrophobe Regionen an der Oberfläche (Klotz, 1970). Diese Stellen sind der Wechselwirkung mit hydrophoben Liganden zugänglich (Hjerten, 1976). Werden Phenylreste in geeigneter Weise an ungeladene Sepharose gebunden, kann eine Wechselwirkung der  $\pi$ -Elektronen der chromatographierten Proteine mit den gebundenen Liganden die Retention dieser Proteine bedingen. Dabei wird die Bindungsneigung durch den Abbau der Hydrathülle der Proteine durch Ammoniumsulfat gesteigert (Pahlman et al., 1977).

200 ml Phenylsepharosesuspension wurden mit gepufferter Ammoniumsulfatlösung (25% Sättigung, in 20 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8,0) äquilibriert und am Wasserstrahlvakuum entgast. Diese Suspension wurde in eine Chromatographiesäule (Durchmesser 5 cm, Länge 20 cm) gefüllt und bei einer Flußrate von  $10 \text{ ml h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  mit dem gleichen Puffer gepackt.

50 ml der durch Ammoniumsulfatpräzipitation vorgereinigten Probe wurden zur Adsorption bei einer Flußrate von  $5 \text{ ml h}^{-1} \text{ cm}^{-2}$  über das Gelbett gepumpt, mit gepufferter Ammoniumsulfatlösung gewaschen und wie folgt eluiert:

- |                                               |               |
|-----------------------------------------------|---------------|
| 1. Kaliumphosphatpuffer, 20mM pH 8,0          | 7 Bettvolumen |
| 2. Destilliertes Wasser                       | 7 Bettvolumen |
| 3. 1,2-Äthandiol, 50% in destilliertem Wasser | 4 Bettvolumen |

Der Säulenausfluß wurde mit einem UV-Photometer (Uvicord II, LKB, Gräfelfing) bei einer Wellenlänge von 280 nm vermessen und in 40ml Fraktionen gesammelt (Ultrorac III, Pharmacia, Freiburg).

Zur Bestimmung des Gehaltes an viralem Antigen wurden Aliquots der Fraktionen 1:10 in Verdünnungslösung verdünnt und auf HBeAg untersucht.

### III.9.5: Isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel:

Proteine weisen stets ein charakteristisches Verhältnis geladener Aminosäuren auf. Im elektrischen Feld wandern sie deshalb in die Richtung der ihrer eigenen Ladung komplementären Elektrode. Durchlaufen die Proteine dabei einen pH-Gradienten, wie er durch Ampholyte ausgebildet werden kann, verändern sie ihre Nettoladung bis zum Ladungsausgleich. Die Wanderungsgeschwindigkeit an diesem Punkt ist null, wodurch eine starke Anreicherung (Fokussierung) der Proteine am isoelektrischen Punkt erreicht wird (Righetti and Drysdale, 1975).

HBeAg-positive Fraktionen der Phenylsepharosechromatographie wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Amicon Ultrafiltrationskammer, Durchmesser 52 mm) auf ein Volumen von 120 ml eingeengt.

Nach Zugabe von Harnstoff (Olsson and Laas, 1981) bis zu einer Konzentration von 8 M wurden 7,5 g Sephadex IEF und 6 ml Pharmalyte (pH-Bereich 4 - 6,5) zugefügt. Mit dem Glasstab wurde das Gel gerührt und nach 30 min Quellzeit 10 min am Wasserstrahlvakuum entgast.

In einem Geltrog (24,5 x 11 x 0,5 cm) wurden an den Querseiten Elektrodenstreifen (110 x 5 x 2 mm, LKB Instruments, Gräfelfing) eingepaßt, die Gelsuspension eingefüllt und gleichmäßig verteilt. Trockenes Sephadex IEF wurde so lange auf das Gel gestreut, bis es sich nach Kippen auf 45° nicht mehr bewegte (entsprechend der Bedienungsanleitung von Pharmacia, Freiburg). Die Elektrodenstreifen wurden mit je 1 ml Pharmalyte (pH-Bereich 4 - 6,5; 1:15 in H<sub>2</sub>O) befeuchtet.

Die Fokussierung (Multiphor, LKB, Grärfeling) erfolgte bei 18°C 6 h lang mit einer konstanten Leistung von 30 Watt (LKB Powersupply).

Danach wurde das Gel mit dem Fraktioniergitter unterteilt. Der pH-Wert der Einzelfraktionen wurde mit einer Flachbodenelektrode bestimmt, und die Fraktionen in silikonisierten Glasröhrchen gesammelt.

Zur Elution von HBeAg wurde das Gel mit 2,5 ml Puffer (0,1 M TRIS-HCl pH 7,0, 1% SDS) versetzt, worauf die Röhrchen 12 h bei 4°C über die Längsachse rotiert wurden. Aliquots (50 µl) wurden mit PBS 1:10 verdünnt, und die jeweils vorhandene Menge an HBeAg bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde entsprechend der optischen Dichte berechnet.

### III.9.6: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE):

Durch die Anlagerung von SDS an Proteine in einem konstanten Gewichtsverhältnis (Reynolds and Tanford, 1970) wird dort eine homogene negative Ladung erreicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld wird wegen der gleichen Ladungsdichte ausschließlich nach dem Molekulargewicht (Shapiro et al., 1967) durch die Filtrationswirkung der Polyacrylamidmatrix bestimmt (Weber and Osborn, 1969; Neville, 1971).

Die SDS-PAGE wurde nach einer Modifikation der von Lämmli (1970) beschriebenen Methode in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten (17x17 cm) polymerisiert, die durch Abstandhalter 0,75 mm auseinandergehalten wurden. Die Trenngele enthielten 23% Acrylamid, 0,26% Diallyltartardiamid, 0,15% SDS und 0,375 M TRIS-HCl pH 8,5. Die Polymerisation wurde durch Zusatz von 0,14 mM AMPER und 0,035% TEMED eingeleitet.

Das Sammelgel enthielt 3,1% Acrylamid, 0,08% DATD, 0,1% SDS und 0,125M TRIS-HCl pH 7,0. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 0,025 M TRIS-HCl pH 8,5, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS.

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA mit einer oberen Leistungsgrenze von 2,5 Watt über Nacht durchgeführt, bis die Pufferfront, erkennbar am zugesetzten Bromphenolblau, das untere Gelende erreichte.

Als Molekulargewichtsmarker wurden die Proteinmischungen von BioRad (Low Molecular Weight Protein Standards) und BRL (Prestained Protein Molecular Weight Standards) eingesetzt.

Bei Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue wurden die BioRad-Marker in einer Konzentration von 10µg pro Protein und Slot, bei Anfärbung mit Silber von 0,05µg pro Protein und Slot eingesetzt.

### III.9.7: Färbeverfahren der SDS-Polyacrylamidgele:

#### 1.Färbung mit Coomassie Brilliant Blue:

Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer 1%-igen Lösung von Coomassie Brilliant Blue R 250 in einem Gemisch aus 1 Teil 2-Propanol, 1 Teil Essigsäure und 4 Teilen Wasser unter konstantem Schaukeln während einer Stunde bei Raumtemperatur gefärbt und fixiert (Weber and Osborn, 1969). Die anschließende Entfärbung erfolgte während mehrerer Stunden durch eine Lösung bestehend aus 2-Propanol, Eisessig und Wasser (1+1+8 Volumina) unter konstantem Schaukeln, wobei die Entfärbelösung mehrfach gewechselt wurde.

#### 2.Silberfärbung:

Da sich die Färbung der SDS-Gele mit Coomassie Brilliant Blue auch in Modifikationen (Blakesley und Boezi, 1977; Vesterberg et al., 1977) häufig als zu wenig empfindlich erwies, wurden die Gele in diesen Fällen mit Silber angefärbt. Unter den zur Wahl stehenden Methoden (Ochs et al., 1981) wurde die Färbetechnik von Oakley et al. in einer Modifikation angewendet (Oakley et al., 1980).

Tabelle 1: Ablauf der Silberfärbung:

|                   |            |                                                                              |
|-------------------|------------|------------------------------------------------------------------------------|
| 1.Fixieren        | 30min      | Methanol/Eisessig/Wasser<br>(5:1:4 Teile, insgesamt 250ml)                   |
| 2.Fixieren        | über Nacht | Methanol/Eisessig/Wasser<br>(1:2:18 Teile, insgesamt 250ml)                  |
| 3.Fixieren        | 30min      | Glutardialdehyd 10%, 250ml                                                   |
| 4.Waschen         | mind. 2h   | 250ml Wasser,<br>mindestens 10 Wechsel                                       |
| 5.Sensibilisieren | 15min      | 30ml NaOH 0,1M,<br>2,1ml Ammoniak ,<br>1,2g Silbernitrat,<br>Wasser ad 150ml |
| 6.Waschen         | 5min       | 250ml Wasser, 1 Wechsel                                                      |
| 7.Färben          | ca. 10min  | 10mg Citronensäure, 125µl<br>Formaldehyd, 250ml Wasser                       |
| 8.Bleichen        | ca. 1min   | 25g Natriumthiosulfat,<br>2,5g Kaliumhexacyanoferrat (III),<br>250ml Wasser  |
| 9.Waschen         | 1h         | 250ml Wasser, 5 Wechsel                                                      |
| 10.Stabilisieren  | 10min      | 45% Methanol, 5% Glycerin<br>(insgesamt 250ml)                               |

Beide Färbetechniken können miteinander kombiniert werden, wenn nach der weniger empfindlichen Coomassie-Färbung die um zwei Zehnerpotenzen empfindlichere Silberfärbung angeschlossen wird (Allen, 1980). Dabei entfallen die Schritte 1 und 2 der Silberfärbung.

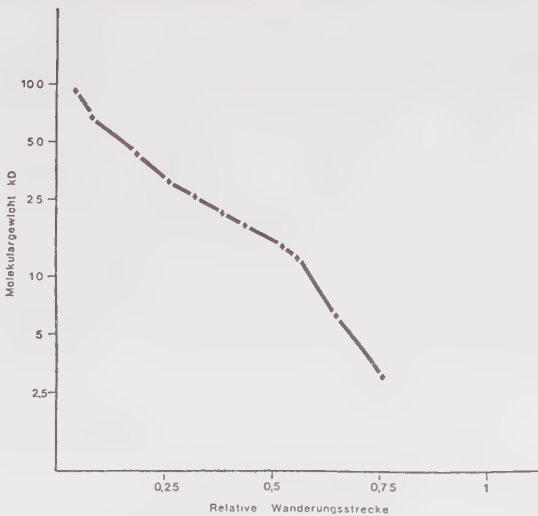
Die Gele wurden nach Beendigung der Färbeprozedur auf Whatman 3MM Filterpapier bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

Die Molekulargewichte der einzelnen aufgelösten Proteinbanden konnten entweder mittels Linearregression und der Methode der kleinsten Fehlerquadrate oder mit Hilfe von halblogarithmischem Papier im Vergleich zur Wanderungsstrecke der Markerproteine ermittelt werden. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2: Molekulargewichte der als Marker verwendeten Proteine:

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| Insulin (A+B-Ketten)         | ca 3000 D |
| Trypsin Inhibitor vom Rind   | 6200 D    |
| Cytochrom C                  | 12000 D   |
| Lysozym                      | 14400 D   |
| $\beta$ -Lactoglobulin       | 18400 D   |
| Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor | 21500 D   |
| Chymotrypsinogen             | 25300 D   |
| Carboanhydrase               | 31000 D   |
| Ovalbumin                    | 45000 D   |
| BSA                          | 66200 D   |
| Phosphorylase B              | 92500 D   |

In Abbildung 8 ist das Wanderungsverhalten dieser Markerproteine in einem 23%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgezeigt.

Abbildung 8: Beziehung zwischen Molekulargewicht und Wanderungsstrecke von Proteinen im SDS-PAGE:

♦ Markerproteine (s. Tabelle 2)

SDS-PAGE (23 % Acrylamid) von Markerproteinen zur Bestimmung des Molekulargewichts aus dem Wanderungsverhalten. Unter den gewählten Versuchsbedingungen besteht kein lineares Verhältnis zwischen dem Molekulargewicht (Y-Achse) und der Wanderungsstrecke (X-Achse).

### III.9.8: Semipräparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Die semipräparative SDS-PAGE wurde, wie für analytische Gele beschrieben, in 3 mm dicken Gelen durchgeführt.

Die Gipfelfraktion des durch IEF vorgereinigten HBeAg wurde mit 3 ml SDS-Probenpuffer versetzt, im kochenden Wasserbad 5 min inkubiert und auf das Sammelgel aufgetragen.

Die Elektrophorese lief bei konstanter Stromstärke von 20 mA über Nacht. Wenn die Front des Bromphenolblaus das Gelende erreicht hatte, wurde die Elektrophorese abgebrochen, an den Rändern wurden jeweils 2 cm breite Streifen des Gels abgeschnitten und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt, um eine Lokalisierung der aufgetrennten Proteine zu ermöglichen. Das Restgel wurde in etwa 2 mm breite Streifen zerteilt und wie im Folgenden beschrieben weiterverarbeitet.

### III.9.9: Elution von HBeAg aus Polyacrylamidgelen:

Die geschnittenen Gelstreifen wurden mit einem Skalpell zerkleinert und durch den Luerkonus einer 2 ml-Einmalspritze gepreßt. Dieses Morcellieren wurde zweimal wiederholt, die Gelfragmente in 5 ml destilliertem Wasser resuspendiert und über Nacht bei 4°C in einem Schüttler bewegt. Nach Zentrifugation (4000 G, 10 min) wurde die Elution nach Abheben des Eluats mit 5 ml Elutionspuffer (50 mM  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$ , 0,1% SDS) wiederholt. Die erhaltenen Überstände wurden vereinigt, und 100 µl Aliquots in der Verdünnung 1:5 in Verdünnungslösung für den HBeAg-Test eingesetzt.

Proteinfractionen mit hoher Antigenaktivität wurden in einem analytischen Gel (SDS-PAGE; 23% Acrylamid; 0,75mm Dicke) wie oben beschrieben aufgetrennt, um eine Aussage über den Erfolg dieses Reinigungsschrittes zu erhalten.

### III.9.10: Entfernung von SDS aus PAGE-Eluaten:

Überschüssiges SDS stört wegen seines Einflusses auf die Sekundär- und Tertiärstruktur (Cone and Marchalonis, 1974; Crumpton and Parkhouse, 1972) viele Reaktionen, die zur näheren Charakterisierung von Proteinen

zur Anwendung kommen. Von den in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Entfernung von SDS (Goyert et al., 1982) war nur eines anwendbar. Die hier verwendete Methode der SDS-Entfernung ist eine Gelfiltration des Proteins an Biogel P-6DG (Christopherson et al., 1979). Hierzu wurde in den Boden eines silikonisierten Eppendorfreaktionsgefäßes (Eppendorf Gerätebau, Hamburg; 1,5 ml) mit einer Kanüle (17 gauge) ein Loch gestochen und dieses mit Filterpapier (Whatman 1MM) abgedeckt. Nun wurde 1ml in 100% Ameisensäure vorgequollenes P-6DG-Material auf das Filterpapier gegossen, und das Röhrchen in einem zweiten Röhrchen 3 min bei 3000 G in einer Laborzentrifuge zentrifugiert.

Vor der Filtration wurden Fraktionen mit hoher Antigenaktivität tiefgefroren (Methanol/Trockeneis) und in einer Gefriertrocknungsanlage (Christ, Osterode) lyophilisiert. Dieses gefriergetrocknete Material wurde in 100µl 100%iger Ameisensäure aufgenommen und auf das P-6DG Gelbett pipettiert, dieses 2 min bei 6000 G zentrifugiert, und das Zentrifugat aufgefangen.

Letzteres Material wurde 1:3 verdünnt und in verschraubbaren Mikrodialysierkammern gegen destilliertes Wasser 24 h bei 4°C unter ständigem Rühren dialysiert. Das Wasser wurde nach jeweils 6 h gewechselt.

Die dialysierte Probe wurde in silikonisierte Eppendorfreaktionsgefäße überführt, tiefgefroren und in einer Speedvac-Zentrifuge (Savant Instruments Inc., Hicksville, N.Y., U.S.A.) erneut gefriergetrocknet.

### III.10: Isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen:

Gellösungen für die isoelektrischen Fokussierungen und für die Non-Equilibrium-pH-Gradient-Electrophoresis (NEPHGE) wurden wie bei Anderson und Anderson (1977, 1978) beschrieben angesetzt (Siehe Punkt II.8).

Die Gellösung aus Harnstoff, Pharmalyte, Acrylamid und Wasser wurde entgast, bevor NP 40, AMPER und TEMED zugesetzt wurden.

## 1. Gele für 2-dimensionale Elektrophorese:

Wenn die isoelektrische Fokussierung als erste Dimension diente (O'Farrell, 1974; Ames and Nikaido, 1976), wurden 100 µl der vorbereiteten Gellösung in Einmalmikropipetten (Volumen 100 µl; Brand, Wertheim) gesaugt. Nach der Polymerisation wurden die Gele zunächst für 30 min mit 8M Harnstofflösung, dann mit IEF-Probenpuffer (beschrieben unter Punkt II.7) für 2 h überschichtet. Nach dieser Zeit wurde der Puffer gewechselt, die Gele wurden in die Fokussierungsapparatur eingesetzt und 15 min bei 200 V, 30 min bei 300 V und 30 min bei 400 V vorfokussiert. Als Anodenlösung diente 0,01 M Phosphorsäure (1 ml 85%  $H_3PO_4$  in 1460 ml  $H_2O$ ), als Kathodenlösung 0,02 M Natronlauge (0,8g NaOH in 1000 ml deionisiertem und entgastem Wasser). 10 µl der Proben wurden mit 10 mg Harnstoff und 10 µl IEF-Probenpuffer versetzt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Vorfokussierung wurde die Kathodenlösung entfernt, und die Proben wurden mit Hilfe einer Glasspritze (Hamilton, Bonaduz) auf das Gel übertragen. Nach Zugabe frischer Kathodenlösung wurde die Fokussierung während 16 h bei 400 V, dann 1 h bei 800 V durchgeführt.

Die Gele wurden vorsichtig aus der Mikropipette gedrückt, am Anodenende markiert, 10 min in SDS-Probenpuffer äquilibriert, direkt auf das Sammelgel eines SDS-Gels gelegt und dort mit 0,9% Agarose in SDS-Probenpuffer fixiert. Die Elektrophorese in der zweiten Dimension erfolgte wie unter SDS-PAGE beschrieben (Siehe Punkt III.9.6), das Gel wurde anschließend mit Silber angefärbt.

## 2. Isoelektrische Fokussierung im Polyacrylamidflachgel:

Die Gellösung wurde wie oben beschrieben zubereitet und in eine Gelkassette pipettiert. Diese bestand aus Glasplatten (260x110x3 mm), von denen eine mit Gelbondfolie (LKB Instruments, Gräfelfing) bedeckt war. Die Geldicke betrug 1 mm. Dymotapestreifen (10x5 mm; DYMO) dienten als Slotformer für Probenmengen bis zu 15 µl. Als Elektrodenstreifen diente Filterpapier (260x5x2mm, LKB Instruments, Gräfelfing), Elektrodenlösungen waren 0,01M Phosphorsäure (Anode) und

0,02M Natronlauge (Kathode). Laufbedingungen: Spannung: maximal 2000 V; Stromstärke: maximal 20 mA; Leistung: 6 W; Fokussierzeit: 6 h; Kühltemperatur: 18°C.

Nach der Fokussierung wurde das Gel geteilt. Der eine Teil wurde in Einzelfractionen von 3mm Dicke zerschnitten, diese mit 500µl PBS suspendiert und 24 h unter Schütteln bei 4°C eluiert. 400µl dieser Eluate wurden auf HBeAg untersucht. Die Proteine im anderen Teil des Gels wurden mit Silber angefärbt.

### III.11: Aminosäurenanalyse:

#### Probenvorbereitung:

Gefriergetrocknete Proben wurden in 25µl destilliertem Wasser gelöst und in Hydrolyseröhrchen (Länge 3 cm, Innendurchmesser 4 mm) pipettiert. Es wurden 25 µl 37%-ige HCl zugefügt, und die Röhrchen unter Stickstoff abgeschmolzen, um die oxidative Zerstörung der Aminosäuren gering zu halten.

Die Hydrolyse erfolgte bei 105°C während 24 h. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Röhrchen kurz zentrifugiert, aufgebrochen, der Inhalt 1:2 mit sterilem destilliertem Wasser verdünnt, tiefgefroren und in einer Speedvac-Zentrifuge gefriergetrocknet.

#### Aminosäurenanalyse:

Diese wurde von Herrn Prof. Dr. Eulitz, Institut für Hämatologie der GSF an einem automatischen Aminosäurenanalysator (Biotronic, LC 50) durchgeführt. Die Trennung der Aminosäuren erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie, die Anfärbung mit Ninhydrin.

### III.12: Spaltung von Peptidbindungen am C-Terminus von Methionin durch Cyanogenbromid (CNBr):

Proteine werden durch CNBr unter relativ milden Bedingungen gespalten (Gross and Witkop, 1961). Dabei wird spezifisch nach elektrophilem Angriff am S-Atom mit der Carboxylgruppe des Methionins ein

Peptidylhomoserinlacton unter Abspaltung von Methylthiocyanat gebildet (Gross, 1967).

Für die CNBr-Spaltung wurden die gefriergetrockneten Proben in 70%-iger Ameisensäure mit einem Zusatz von 0,1% SDS gelöst und mit CNBr-Lösung (0,1 mg/ml in 70%-iger Ameisensäure) versetzt. Das quantitative Verhältnis Reagenz:Probe war 280:1 bezogen auf Methionin (Chu and Yasunobu, 1964).

Die Spaltungsreaktion wurde bei 37°C für 24 h im Wasserbad durchgeführt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Proben mit dem gleichen Volumen von destilliertem Wasser verdünnt und in einer Speedvac-Zentrifuge gefriergetrocknet.

Die Produkte der Spaltungsreaktion wurden durch SDS-PAGE analysiert, die Gele in Scheibchen geschnitten (1,5mm) und die immunologische Reaktivität der Peptide mit dem HBeAg-Test nach Elution aus dem Gel (Methode wie unter III.9.9 beschrieben) bestimmt.

#### IV: Ergebnisse:

##### IV.1: Bestimmung von HBeAg durch Radioimmunoassay:

##### IV.1.1: Bestimmung der Spezifität des Tests zum Nachweis von HBeAg:

Die Kugeln des verwendeten HBeAg-Tests sind mit dem Plasma eines Trägers des HBsAg beschichtet. Neben HBsAg finden sich Antikörper gegen HBeAg und gegen HBcAg in diesem Plasma. Das gleiche Plasma dient auch als Quelle für die radioaktiv markierten Antikörper (Norkrans et al., 1979). Der Titer für anti-HBe beträgt 1:5000, der für anti-HBc 1:15000. Wegen des höheren anti-HBc-Titers ist in gleichem Maß die Empfindlichkeit des Tests gegenüber HBcAg erheblich größer als gegen HBeAg. Deshalb werden in diesem Test sowohl HBeAg als auch HBcAg nachgewiesen. Beim diagnostischen Test spielt dies deshalb keine Rolle, weil HBcAg, falls überhaupt im Serum oder Plasma vorhanden, durch den hohen Überschuß an anti-HBc in Immunkomplexen gebunden ist und aus diesem Grund nicht vom Test erfaßt werden kann. Wird aber im Verlauf einer biochemischen Reinigung dieser möglicherweise vorhandene Antigen-Antikörperkomplex gelöst, muß durch einen zusätzlichen HBcAg-spezifischen Test das Vorhandensein von HBcAg nachgewiesen bzw. ausgeschlossen werden.

Einen ersten Hinweis auf HBcAg erhält man durch die Menge der gemessenen cpm. Im Falle von HBeAg als Positivkontrolle erhält man maximale Zählraten von  $10^4$  cpm, im Fall von HBcAg als Positivkontrolle wegen der höheren Empfindlichkeit des Tests gegenüber HBcAg jedoch  $5 \times 10^4$  cpm.

Zur Unterscheidung zwischen HBeAg und HBcAg wurden Proben, die im HBeAg-Test Zählraten über dem 1,2-fachen Wert der Positivkontrolle für HBeAg aufwiesen, oder aus Reinigungsschritten stammten, bei denen die Möglichkeit bestand, daß Antigen-Antikörperbindungen gelöst wurden, dem spezifischen HBcAg-Test unterworfen. Dabei wurde als radioaktiv markierter Antikörper  $^{125}\text{J}$ -gelabeltes anti-HBc (CORAB-Test) eingesetzt (Purcell et al. 1973). Der Nachweis der Abwesenheit von HBcAg während der Reinigung des HBeAg ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Ergebnisse des Tests zum Nachweis von HBcAg  
im Verlauf der Reinigung des HBeAg, dargestellt anhand  
eines typischen Experiments:

|                      | HBcAg-RIA | <u>cpm Probe</u>     |
|----------------------|-----------|----------------------|
|                      | cpm/0,2ml | cpm Negativkontrolle |
| Plasma               | 2157      | 1,32                 |
| Phenylsepharose      |           |                      |
| Pool 1               | 2026      | 1,24                 |
| Pool 2               | 1879      | 1,15                 |
| Pool 3               | 1645      | 1,01                 |
| IEF-Pool             | 1702      | 1,04                 |
| SDS-PAGE             |           |                      |
| Fraktion 20, Abb. 16 | 1604      | 0,98                 |

Die Zählrate der Negativkontrolle betrug 1634 cpm, die der Positivkontrolle 9063 cpm.

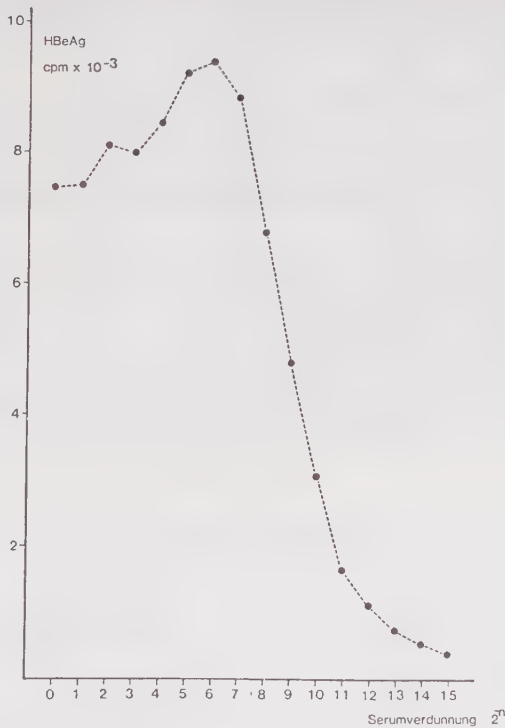
#### IV.1.2: Präzision und Linearität des HBeAg-Tests:

Wurde die gleiche Menge eines Serums oder Plasmas in Mehrfachansätzen getestet, so schwankten die Meßwerte meist in einem Fehlerbereich von  $\pm 10\%$  um den Mittelwert. Dieser Fehler kann auf schlechter Reproduzierbarkeit von Pipette oder Pipettenspitze und auf unterschiedlichen Antikörpermengen auf der Kugel beruhen.

Bestimmt man den Antigengehalt eines Serums oder Plasmas durch Titration, so ergibt die Verdünnung der zu prüfenden Probe um den Faktor 2 selten eine Halbierung der gemessenen Zerfälle pro Minute. Besonders im Bereich niederer Verdünnungsstufen hochtitriger Seren oder Plasmen wird das sogenannte Prozonenphänomen deutlich (Abbildung 9).

Dies kann durch sterische Hinderungen des Antigens an den Bindungsstellen einen zu geringen Antigengehalt vortäuschen. In Abbildung 9 ist dieses Phänomen in einem repräsentativen Experiment dargestellt.

Abbildung 9: Darstellung des Prozonenphänomens beim HBeAg-Test am Beispiel des zur Reinigung verwendeten Plasmas:



Kontrollen: positiv: 8971cpm; negativ: 339 cpm.

Darstellung der gemessenen cpm des HBeAg-Tests des zur Reinigung verwendeten Plasmas, bei Verdünnung in Zweierschritten. Das Ergebnis der Proben in niedrigen Verdünnungsstufen ist typisch für das Vorliegen des Prozonenphänomens. Die Forderung, daß eine Verdünnung um den Faktor 2 eine Halbierung der Zählrate bedingt, ist nur im Bereich der Verdünnungen von  $2^{-12}$  bis  $2^{-14}$  gegeben. Die Steigung der Geraden im Bereich der Verdünnungen  $2^{-8}$  bis  $2^{-10}$  entspricht dagegen nicht einem Winkel von 45 Grad.

Die Forderung, daß eine Verdünnung des Plasmas um den Faktor 2 auch eine Halbierung der Zählrate bedingen sollte, bestand in diesem Testsystem weitgehend im Bereich von Zählraten zwischen dem 2,1-fachen Wert der Zählrate der Negativkontrolle (cut-off Wert) und dem 7-fachen Wert der Zählrate der Negativkontrolle.

Zum Vergleich von Zählraten bei verschiedenen Testansätzen und Verdünnungen wurde eine Formel ermittelt, die zum einen die Schwankungsbreite in der Zählrate der Negativkontrolle berücksichtigt, zum anderen gestattet, die Einflüsse hoher Antigenkonzentration auszuschalten. Diese Formel lautet:

$$\text{cpm Positivkontrolle} - \text{cpm Negativkontrolle} = \text{cpm Netto}$$

$$\text{cpm Netto} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{konstant}$$

In Tabelle 4 ist anhand der Daten des Experiments, das in Abbildung 9 vorgestellt wurde, dargestellt, wie durch Anwendung dieser Rechengrundlage der Antigengehalt eines HBeAg-positiven Plasmas ermittelt werden konnte. In den Verdünnungen  $2^{-12}$  und  $2^{-13}$  sind die so berechneten cpm/ml identisch, so daß in dem vorliegenden Beispiel ca.  $1,5 \times 10^7$  cpm/ml an HBeAg im Plasma enthalten sind.

#### IV.1.3: Quantitative Bestimmung von HBeAg:

HBeAg-haltiges Plasma wurde wie beschrieben verdünnt und im RIA auf Antigengehalt untersucht. Der Titer dieses Plasmas betrug  $1:2^{13}$ , die Menge an gebundener Radioaktivität im Test wurde mit  $1,5 \times 10^7$  cpm/ml berechnet (siehe Tabelle 4). Dies entspricht, wie die in Punkt IV.6 (siehe Seite 60) aufgezeigte Berechnung verdeutlicht,  $5\mu\text{g HBeAg / ml}$ .

Tabelle 4: Bestimmung des HBeAg-Gehalts des zur Reinigung verwendeten Patientenplasmas:

| Verdünnung                  | cpm/0,2 ml | cpm netto | Faktor | cpm/ml   |
|-----------------------------|------------|-----------|--------|----------|
| 1:1 (2 <sup>0</sup> )       | 7433       | 7094      | 5      | 35470    |
| 1:2 (2 <sup>-1</sup> )      | 7501       | 7162      | 10     | 71620    |
| 1:4 (2 <sup>-2</sup> )      | 8089       | 7750      | 20     | 155000   |
| 1:8 (2 <sup>-3</sup> )      | 7981       | 7642      | 40     | 305680   |
| 1:16 (2 <sup>-4</sup> )     | 8422       | 8063      | 80     | 646640   |
| 1:32 (2 <sup>-5</sup> )     | 9187       | 8848      | 160    | 1415680  |
| 1:64 (2 <sup>-6</sup> )     | 9369       | 9030      | 320    | 2889600  |
| 1:128 (2 <sup>-7</sup> )    | 8543       | 8204      | 640    | 5255060  |
| 1:256 (2 <sup>-8</sup> )    | 6759       | 6420      | 1280   | 8217600  |
| 1:512 (2 <sup>-9</sup> )    | 4776       | 4437      | 2560   | 11358720 |
| 1:1024 (2 <sup>-10</sup> )  | 3054       | 2715      | 5120   | 13900800 |
| 1:2048 (2 <sup>-11</sup> )  | 1631       | 1292      | 10240  | 13230080 |
| 1:4096 (2 <sup>-12</sup> )  | 1092       | 753       | 20480  | 15421440 |
| 1:8192 (2 <sup>-13</sup> )  | 717        | 378       | 40960  | 15482880 |
| 1:16384 (2 <sup>-14</sup> ) | 524        | 185       | 81920  | 15155200 |
| 1:32768 (2 <sup>-15</sup> ) | 378        | 39        | 163840 | 6389760  |

Kontrollen: positiv: 8971 cpm; negativ: 339 cpm

#### IV.1.4: Einfluß des Verdünnungsgrades auf die Mindestzählrate:

Um den Einfluß des Verdünnungsgrades des zu testenden Plasmas auf die Mindestzählrate (background) des Testsystems zu untersuchen, wurde Plasma, das frei von HBV-Markern war, mit PBS verdünnt und dem HBeAg-Test unterworfen. Das Ergebnis eines solchen Experiments ist in Tabelle 5 aufgezeigt. Das Experiment wurde im Doppelansatz durchgeführt, die Zählraten stellen den Mittelwert der Zählraten der Einzelproben dar.

Tabelle 5: Einfluß des Verdünnungsgrades auf den background des HBeAg-RIAs:

| Verdünnung | cpm/ 0,2 ml | % der Negativkontrolle |
|------------|-------------|------------------------|
| unverdünnt | 348         | 100                    |
| 1:2        | 323         | 93                     |
| 1:4        | 388         | 111                    |
| 1:10       | 403         | 116                    |
| 1:100      | 489         | 141                    |
| 1:1000     | 570         | 164                    |

Die Zählraten der Einzelwerte unterschieden sich um nicht mehr als 10% vom Mittelwert. Die Zählrate der Positivkontrolle betrug 5894 cpm.

Wie das Experiment zeigt, nimmt die Menge der unspezifisch an die Kugeln gebundenen Radioaktivität mit der Verdünnung zu. Deshalb wurden die in dieser Arbeit verwendeten Verdünnungen in 0,9% Kochsalzlösung, die 10% Plasma ohne HBV-Marker enthielt, durchgeführt.

#### IV.1.5: Einfluß von SDS auf den immunologischen Nachweis von HBeAg:

Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein ionisches Detergens, das durch Anlagerung an Protein dessen Sekundär- und Tertiärstruktur verändert. Durch Zusatz von SDS zu Proteinlösungen ist daher eine Änderung der antigenen Struktur zu erwarten, die den immunologischen Nachweis beeinflusst (Crumpton and Parkhouse, 1972; Cone and Marchalonis, 1974). Tabelle 6 zeigt den Einfluß steigender SDS-Konzentrationen in Plasma auf die Empfindlichkeit des verwendeten Testsystems. Als Kontrolle diente das gleiche Plasma ohne Zusatz von SDS.

Tabelle 6: Einfluß von SDS in verschiedenen Konzentrationen auf die Empfindlichkeit des HBeAg-Tests:

Zur Untersuchung wurde das Plasma der Positivkontrolle des HBeAg-Tests in einer Verdünnung von 1:2 verwendet:

| % SDS | cpm HBeAg | cpm netto | Ausbeute in % |
|-------|-----------|-----------|---------------|
| 0     | 7700      | 7175      | 100           |
| 0,01  | 7695      | 7170      | 100           |
| 0,05  | 7536      | 7011      | 98            |
| 0,1   | 2514      | 1989      | 28            |
| 0,2   | 873       | 348       | 5             |
| 0,5   | 940       | 415       | 6             |
| 1     | 673       | 148       | 2             |
| 2     | 595       | 70        | 1             |
| 5     | 530       | 5         | -             |

Der Mittelwert der Negativkontrolle lag bei 525 cpm.

#### IV.1.6: Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf den immunologischen Nachweis von HBeAg:

2-Mercaptoäthanol (2-ME) bewirkt die reversible Spaltung von Disulfidbrücken an Cysteinresten in Proteinen (Weber and Osborn, 1969) und beeinflusst dadurch die Sekundär- und Tertiärstruktur (Stryer, 1975) von Antigenen und Antikörpern und damit deren Affinität. Den Einfluß steigender Konzentrationen von 2-Mercaptoäthanol in Plasma auf die Sensitivität des HBeAg-Tests gibt Tabelle 7 wieder. Als Kontrolle diente das gleiche Plasma ohne Zusatz von 2-Mercaptoäthanol.

Tabelle 7: Einfluß von 2-Mercaptoäthanol auf  
die Empfindlichkeit des HBeAg-Tests:

Zur Untersuchung wurde das Plasma der Positivkontrolle des HBeAg-Tests in der Verdünnung von 1:2 verwendet:

| % 2-ME | cpm HBeAg | cpm netto | Ausbeute in % |
|--------|-----------|-----------|---------------|
| 0      | 7700      | 7175      | 100           |
| 0,01   | 7321      | 6796      | 95            |
| 0,05   | 6875      | 6350      | 89            |
| 0,1    | 5724      | 5199      | 72            |
| 0,2    | 4255      | 3730      | 52            |
| 0,5    | 3683      | 3158      | 44            |
| 1      | 3128      | 2603      | 36            |
| 2      | 2963      | 2438      | 34            |
| 5      | 2596      | 2071      | 29            |

Der Mittelwert der Negativkontrolle lag bei 525 cpm.

Beide Experimente (Tabelle 6 und 7) zeigen, daß in Gegenwart höherer Konzentrationen von SDS und 2-Mercaptoäthanol eine Bestimmung von HBeAg nicht mehr möglich ist.

#### IV.1.7: Einfluß der Probenmenge auf das Ergebnis des HBeAg-RIAs:

Um den Einfluß des Volumens der in den RIA eingesetzten Proben mit konstantem HBeAg-Gehalt auf das Testergebnis zu ermitteln, wurden 100µl der Positivkontrolle des HBeAg-Tests mit steigenden Mengen von PBS versetzt und wie üblich auf HBeAg getestet. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8: Einfluß der Probenmenge auf die Nachweisempfindlichkeit des HBeAg-RIAs:

Zur Untersuchung wurden 100 µl des Serums der Positivkontrolle des HBeAg-Tests vorgelegt.

| Zugesetzte Menge PBS | cpm HBeAg | cpm netto | Ausbeute in % |
|----------------------|-----------|-----------|---------------|
| 100 µl               | 7700      | 7175      | 100           |
| 200 µl               | 7825      | 7300      | 102           |
| 300 µl               | 7673      | 7148      | 100           |
| 400 µl               | 7598      | 7073      | 99            |
| 500 µl               | 7512      | 6987      | 97            |

Der Mittelwert der Negativkontrolle lag bei 525 cpm.

Das Ergebnis zeigt, daß die Menge der getesteten Probe nur geringen Einfluß auf die Empfindlichkeit des HBeAg-Tests hat, sodaß zum einen bei stark verdünnten Proben durch Steigerung der Probenmenge eine höhere Nachweisempfindlichkeit erreicht werden kann, zum anderen durch Zusatz von Puffer der Einfluß von SDS oder 2-Mercaptoäthanol durch die so erreichte Verdünnung reduziert werden kann.

#### IV.1.8: Bestimmung von HBcAg durch Radioimmunoassay:

Der Nachweis von HBcAg beruht auf dem gleichen Testprinzip wie der Nachweis von HBeAg (siehe Seite 19). Während der ersten Inkubationsphase band HBcAg an das an die Kugel gebundene anti-HBc. In der zweiten Inkubationsphase jedoch reagierte <sup>125</sup>Jod-markiertes anti-HBc spezifisch mit dem gebundenen HBcAg.

Als Positivkontrolle wurde in diesem Fall HBcAg verwendet, das aus menschlicher Leber präpariert wurde. Tabelle 9 zeigt die erreichten cpm für ein typisches Experiment, bei dem ein HBV-Marker-negatives Plasma, ein HBeAg-haltiges Plasma und ein aus menschlicher Leber gereinigtes HBcAg dem beschriebenen Test unterworfen wurden.

Tabelle 9: Spezifität des HBcAg-RIA in Gegenwart von HBsAg und HBeAg:

| Probe:(unverdünntes Material)            | cpm/0,2 ml Probe |
|------------------------------------------|------------------|
| Negatives Plasma:                        | 1687             |
| HBsAg-positives, HBeAg-negatives Plasma: | 1797             |
| HBsAg- und HBeAg-positives Plasma:       | 1777             |
| HBcAg: (1:4 verdünnt in PBS)             | 16326            |

Dieses Experiment wurde im Doppelansatz durchgeführt. Die Zählraten der Einzelwerte wichen um weniger als 15% voneinander ab.

Wie die Daten der Tabelle 9 zeigen, wird weder HBsAg noch HBeAg durch die angewandte Testanordnung entdeckt. Somit besteht mit diesem Test die Möglichkeit, die Anwesenheit von HBcAg zu bestätigen oder auszuschließen.

Während der Reinigung konnte HBcAg im verwendeten Plasma nie nachgewiesen werden.

#### IV.2: Eigenschaften des zur Reinigung von HBeAg benutzten Plasmas:

Zur Reinigung von HBeAg wurden Plasmen verschiedener Entnahmedaten des Patienten (siehe Material und Methoden) eingesetzt. Die mittleren Titer dieses Plasmas betrugen:

##### 1. für HBV-spezifische Marker:

|                |           |
|----------------|-----------|
| HBsAg          | ≥ 1:32000 |
| HBeAg          | 1:5000    |
| HBcAg          | negativ   |
| Delta-Ag       | negativ   |
| DNA-Polymerase | positiv   |
| anti-HBc       | ≥ 1:32000 |

##### 2. für gegen andere DNA-Viren gerichtete Antikörper:

|                                         |         |
|-----------------------------------------|---------|
| Adenoviren                              | negativ |
| Herpes simplex Virus                    | 1:16    |
| Cytomegalievirus                        | negativ |
| Epstein-Barr-Virus, Capsidantigen (VCA) | 1:32    |
| Epstein-Barr-Virus, Kernantigen (EBNA)  | positiv |

Antikörper gegen Hepatitis-A-Virus ließen sich nicht nachweisen, jedoch konnten im Plasma Rheumafaktoren nachgewiesen werden. Der Gehalt an Serumalbumin und IgG, bestimmt durch Nephelometrie, lag stets im Normbereich (Albumin: 35,2 - 50,4 g/l, IgG: 5,8 - 15,2 g/l) (L.Thomas, 1984).

IV.3: REINIGUNG:IV.3.1: Zentrifugation partikulärer Plasmapbestandteile:

Nach der Zentrifugation bei 6000 G, durch die grobe Partikel entfernt wurden, wurden in einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 100000 G Dane-Partikel sowie Immunkomplexe und Zelldetritus entfernt. HBcAg wurde unter diesen Bedingungen nicht pelletiert, während die Polymerasereaktion zum Nachweis von Dane-Partikeln nach diesem Reinigungsschritt im Überstand stets negativ war. Ebenso konnte HBcAg nach diesem Schritt in keinem Fall nachgewiesen werden. Dies zeigt Tabelle 10.

Tabelle 10: Testung auf HBV-DNA-Polymerase und HBcAg nach der Ultrazentrifugation des verwendeten Plasmas:

|                     | DNA-Polymerase:<br>cpm/50µl Probe | HBcAg-Test:<br>cpm/0,2ml Probe |
|---------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Sediment 100000 G-  |                                   |                                |
| Zentrifugation:     | 2258                              | 1518                           |
| Überstand 100000 G- |                                   |                                |
| Zentrifugation:     | 508                               | 1562                           |
| Positivkontrolle:   | 2364                              | 18683                          |
| Negativkontrolle:   | 492                               | 1522                           |

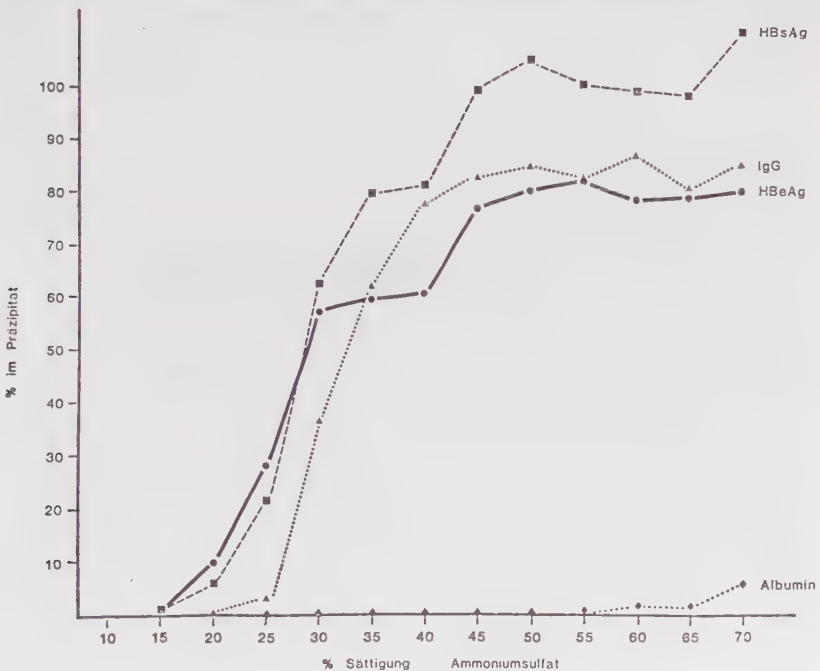
Beide Testansätze wurden als Doppelbestimmungen ausgeführt, die Zählraten der Einzelwerte differierten um weniger als 15 %. Als Positivkontrolle diente eine Dane-Partikelpräparation, als Negativkontrolle menschliches Serum ohne HBV-Marker.

IV.3.2: Ammoniumsulfatpräzipitation:

HBcAg wurde bei einer Ammoniumsulfatsättigung der Lösung von mehr als 30% zu etwa 50% aus dem Plasma ausgefällt. Eine Erhöhung der

Ammoniumsulfatkonzentration auf mehr als 50% Sättigung brachte keine Steigerung der Ausbeute an HBeAg im Präzipitat. Abbildung 10 zeigt, daß HBsAg etwa in der gleichen Weise gefällt wurde, so daß mit diesem Verfahren keine Abtrennung vom HBeAg erreicht werden konnte. Gleichzeitig ist in dieser Abbildung das Präzipitationsverhalten von IgG und Albumin dargestellt. Bei der verwendeten Ammoniumsulfatpräzipitation blieb der größte Teil des Albumins in Lösung.

Abbildung 10: Präzipitationsverhalten von HBsAg bzw. HBeAg bei steigenden Ammoniumsulfatkonzentrationen:

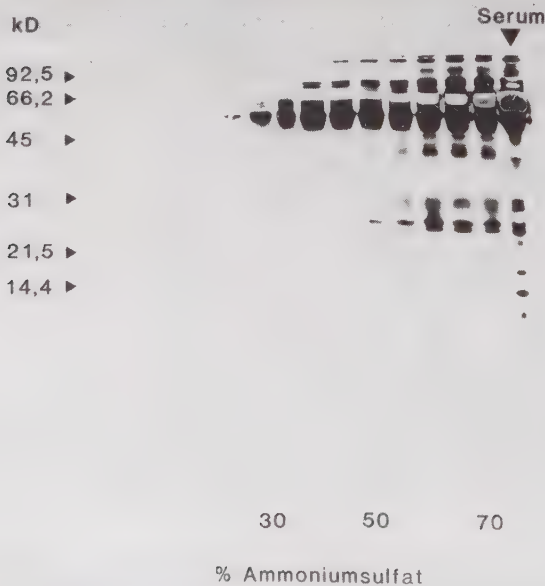


Darstellung der gefundenen Ausbeuten nach Ammoniumsulfatpräzipitation im Vergleich zum Gehalt im Plasma. Um den Vergleich mit den nicht über RIA gemessenen Plasmabestandteilen IgG und Albumin zu ermöglichen, wurden alle Ergebnisse in % angegeben. Bei der Reinigung des HBeAg verwendeten Ammoniumsulfatkonzentration wird der präzipitierbare Anteil des HBeAg, HBsAg und IgG weitgehend, Albumin nur zu einem sehr geringen Prozentsatz abgetrennt.

Die durch steigende Ammoniumsulfatkonzentrationen präzipitierten Proteine wurden in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, um die neben dem HBeAg vorhandenen Proteine zu erkennen. Das erhaltene Gel ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels der Kombination von Coomassie- und Silberfärbung sichtbar gemacht. Es ist deutlich zu erkennen, daß Albumin (Molekulargewicht 68000 D) zwar durch Coomassie Brilliant Blue angefärbt wird, dagegen kaum durch Silberfärbung. Dieses Phänomen ist auch in der Literatur beschrieben (Oakley et al., 1980; Poehling and Neuhoﬀ, 1981), eine Erklärung konnte jedoch bislang nicht gefunden werden.

Abbildung 11: SDS-PAGE des durch Ammoniumsulfatpräzipitation vorgereinigten, HBeAg-positiven Plasmas:



Durch die Kombination von Coomassie- und Silberfärbung sichtbar gemachte Banden der ammoniumsulfatpräzipitierten Plasmaproteine. Die Bezeichnung der einzelnen Bahnen entspricht den Angaben der Ammoniumsulfatpräzipitation in Abbildung 10.

### IV.3.3: Phenylsepharose-Chromatographie:

Das Präzipitat der Ammoniumsulfatbehandlung bei 50% Sättigung wurde in Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser dialysiert. Dabei bildeten sich 2 Fraktionen, eine lösliche und eine unlösliche. Das Verhältnis HBeAg/Protein und der Gehalt an HBeAg war in beiden Fraktionen annähernd gleich. Vom löslichen wurde das unlösliche Material abzentrifugiert, mit festem Ammoniumsulfat bis zur 25%-igen Sättigung versetzt und über eine Phenylsepharosesäule gepumpt. Nichtbindendes Material wurde mit 25% Ammoniumsulfatlösung vom Phenylsepharosegel ausgewaschen.

Eine anschließende Spülung mit ammoniumsulfatfreiem Kaliumphosphatpuffer eluierte die Masse des gebundenen Proteins, wobei nur geringe Mengen HBeAg entfernt wurden.

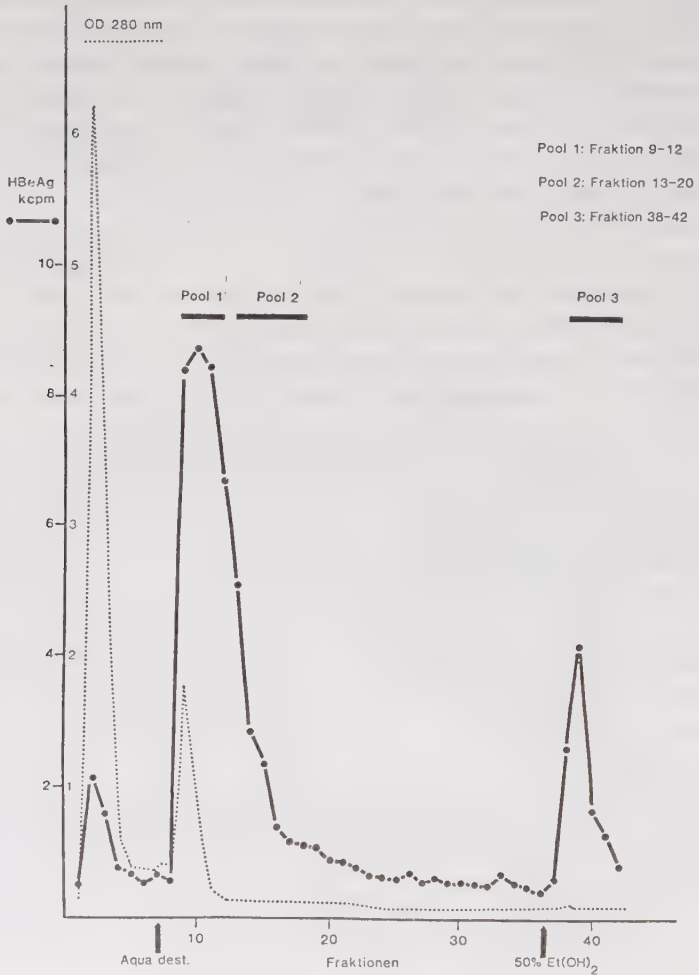
Mit destilliertem Wasser konnte ein weiterer Teil des gebundenen Proteins in einem geringen Volumen eluiert werden (Fraktionen 9-12, Abbildung 12), während sich das HBeAg nur langsam vom Gel löste und in den Fraktionen 9-20 nachgewiesen werden konnte (Pool 1 und 2, Abbildung 12).

Mit 50% Äthandiol konnte ein weiterer Teil des gebundenen HBeAg eluiert werden (Pool 3).

Um Störungen des Tests durch Prozonophänomene auszuschließen, wurden die Einzelfraktionen, angeglichen an die in der Probe vorhandene HBeAg-Menge, in Verdünnungspuffer 1:20 verdünnt. Der Mittelwert der Zählrate der Positivkontrolle lag bei 8952 cpm, der der Negativkontrolle bei 340 cpm. Die Testergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt.

Die Fraktionen mit dem größten HBeAg-Gehalt im Verhältnis zum Protein (Pool 3) aus mehreren gleichartigen Experimenten wurden vereinigt und der weiteren Reinigung unterworfen.

Abbildung 12: Elutionsprofil der Phenylsepharosechromatographie  
von vorgereinigtem HBeAg-positivem Plasma:



Darstellung von Extinktion des Eluats und gemessenen cpm des HBeAg-RIA der Einzelfraktionen. Pufferwechsel sind durch Pfeile am unteren Ende der Abbildung angezeigt. Zur Vermeidung der Einflüsse des Prozonenphänomens wurden die zu testenden Aliquots 1:20 verdünnt. Die eingezeichneten Balken geben die Größe der Pools 1 - 3 wieder. Die entsprechenden Pools aus 8 gleichartigen Experimenten wurden vereint, eine Rechromatographie brachte keine weitere Anreicherung.

Tabelle 11: Reinigungseffekt von Phenylsepharose bei HBeAg-haltigen Plasmen:

|                    | cpm               | cpm/mg Protein    | Anreicherung* | Ausbeute |
|--------------------|-------------------|-------------------|---------------|----------|
| Auftrags-<br>menge | $3,3 \times 10^8$ | $2,7 \times 10^5$ | 1             | 100%     |
| Pool 1             | $3,3 \times 10^7$ | $5,2 \times 10^6$ | 19            | 10%      |
| Pool 2             | $4,0 \times 10^7$ | $1,5 \times 10^7$ | 56            | 12%      |
| Pool 3             | $6,6 \times 10^6$ | $2,5 \times 10^7$ | 93            | 2%       |

\* Mittelwert aus 8 gleichartigen Säulenläufen, Abweichungen vom Mittelwert unter 12%.

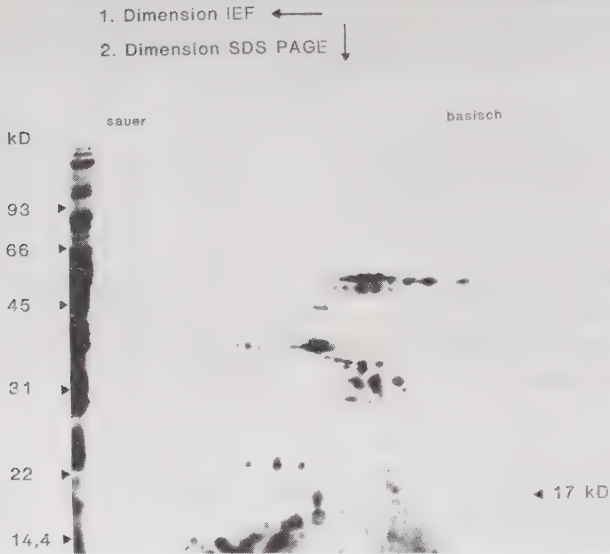
Die Bestimmung des Proteingehalts der einzelnen Pools erfolgte nach der Warburg'schen Formel.

#### IV.3.4: Kontrolle des erzielten Reinigungseffektes durch 2-dimensionale Elektrophorese:

Um eine Aussage über die bisherige Vorreinigung des HBeAg treffen zu können und um das Auftreten von Proteinen mit gleichem Molekulargewicht aber verschiedenem isoelektrischen Punkt zu erkennen (Ames und Nikaido, 1976; Gianazza und Righetti, 1980), wurde ein Aliquot des Pools 3 der 2-dimensionalen Gelelektrophorese unterworfen. Die erste Dimension war eine IEF im Polyacrylamidröhrchengel. Als zweite Dimension wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt, wobei die Acrylamidkonzentration im Gel 17,5% betrug. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit Silber angefärbt.

Wie Abbildung 13 zeigt, ergab die Analyse des Materials von Pool 3, daß sich in dem Molekulargewichtsbereich von ca. 17000 D, in dem HBeAg erwartet wurde, mehrere Proteine durch isoelektrische Fokussierung auflösen ließen. Aus diesem Grund wurde das Material zur weiteren Reinigung der semipräparativen isoelektrischen Fokussierung im granulierten Gel unterworfen.

Abbildung 13: Zweidimensionale Gelelektrophorese von HBeAg-haltigem Material nach Vorreinigung durch Ammoniumsulfatpräzipitation und Phenylsepharosechromatographie (Pool 3):



Die erste Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese war eine IEF, die zweite eine SDS-PAGE. Aufgetragen wurden ein Aliquot von 25 µl des Pools 3, entsprechend 5000 cpm HBeAg und insgesamt 30 µg Protein. Die Anode des fokussierten Gels lag auf der linken Seite des SDS-Gels. Die Angaben der Molekulargewichte wurden mit Hilfe von Markerproteinen ermittelt. Im Bereich des Molekulargewichts von 17000 D, in dem HBeAg erwartet wurde, lassen sich wenigstens 5 verschiedene Proteinflecken erkennen.

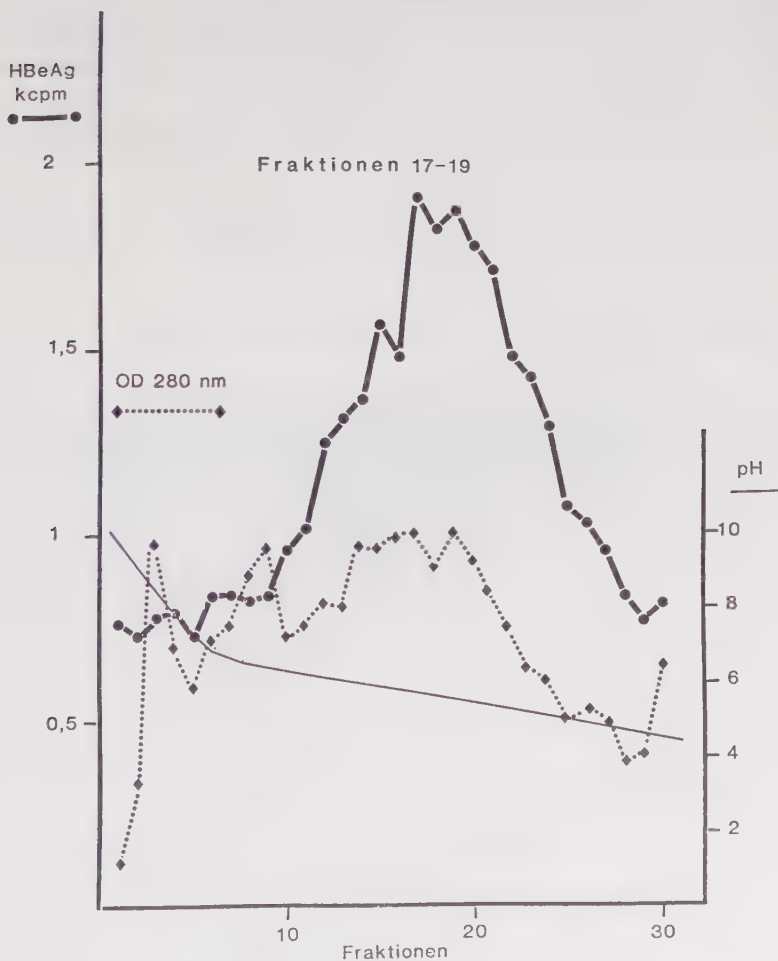
#### IV.3.5: Semipräparative isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel:

Die vereinigten Pool-Fractionen (Pool 3) der Phenylsepharosechromatographie wurden durch Ultrafiltration konzentriert und anschließend fokussiert. Dabei nahm die angelegte Spannung während 4h von 800 V auf 2000V zu, während die Stromstärke von 40 mA auf 3 mA abfiel. Am Ende der Fokussierzeit war ein pH-Gradient von 4 bis 8 ausgebildet.

HBeAg konnte aus dem granulierten Gel nur wiedergewonnen werden, wenn dem Elutionspuffer 1% SDS zugesetzt wurde. Die Auftrennung, die durch

dieses Trennverfahren erreicht werden konnte, ist in Abbildung 14 dargestellt.

Abbildung 14: Auftrennung von durch Phenylsepharosechromatographie vorgereinigtem HBeAg-haltigem Plasma durch präparative isoelektrische Fokussierung:



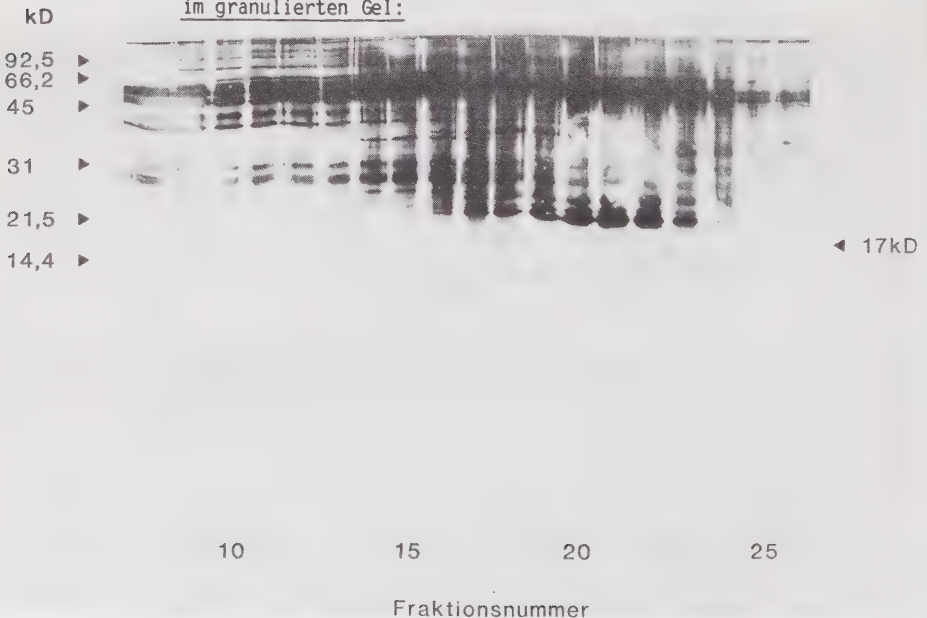
Darstellung der optischen Dichte bei 280 nm durch punktierte Linie, HBeAg-Gehalt durch geschlossene Kreise, der pH-Wert der Einzelfractionen ist durch eine dünne durchgezogene Linie markiert.

Durch die isoelektrische Fokussierung im granulierten Gel konnte HBeAg nicht in einer Fraction konzentriert werden. Es konnte über den gesamten Gradienten nachgewiesen werden, wenn auch eine Konzentrierung im pH-Bereich von 5 - 6 erfolgte.

Es zeigte sich, daß trotz des Zusatzes von Harnstoff (Creighton, 1979; Olsson and Laas, 1981) zum Fokussierungspuffer, durch den die Entfaltung der Proteinkette erreicht und damit die Eliminierung der Abschirmung innerhalb der Tertiärstruktur bewirkt werden sollte, ein scharf begrenzter isoelektrischer Punkt für das HBeAg nicht beobachtet werden konnte. HBeAg konnte über einen pH-Bereich von 4,5 - 6 nachgewiesen werden, wobei das Maximum der HBeAg-Aktivität bei pH 5,5 fokussiert war. Die Fraktionen 8-26 wurden einer analytischen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen. Dieses Gel ist in Abbildung 15 dargestellt.

Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an HBeAg (17-19, siehe Abbildung 14), wurden vereint und der semipräparativen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterworfen. Bei der Reindarstellung des HBeAg wurden drei gleichartige Fokussierungen durchgeführt.

Abbildung 15: Proteinprofil von HBeAg-haltigem Plasma nach IEF  
im granulierten Gel:

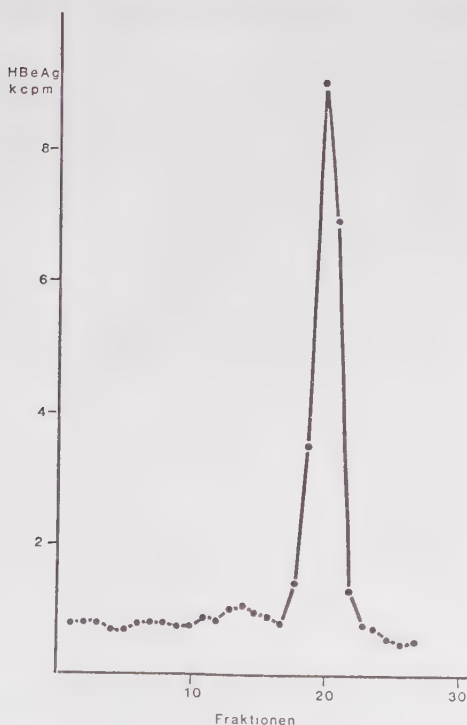


SDS-PAGE der Eluate der Einfeldfraktionen nach der semipräparativen IEF. Die Nummerierung der Slots entspricht der Fraktionsnummer, wie sie aus Abbildung 13 hervorgeht. Die Angaben der Molekulargewichte wurden mit Hilfe von Markerproteinen ermittelt. Der Pfeil auf der rechten Seite der Abbildung markiert das Molekulargewicht 17000 D, bei dem die Bande des HBeAg erwartet wurde.

#### IV.3.6: Semipräparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Da HBeAg selbst nach Zugabe von 1% SDS nur unvollständig aus der Fokussierungsmatrix eluiert werden konnte, wurde die gesamte Probe (Fraktion 17 - 19) zusammen mit der Fokussierungsmatrix mit SDS-Probenpuffer gekocht und insgesamt auf das Sammelgel der halbpräparativen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetragen. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis des HBeAg-RIA nach der Elution des HBeAg aus dem Polyacrylamidgel. Niedrige Fraktionsnummern entsprechen Proteinen mit hohem Molekulargewicht, Fraktion 20 entspricht einem Molekulargewicht von ca. 17000 D.

Abbildung 16: Analyse des Eluats der semipräparativen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese im HBeAg-RIA:



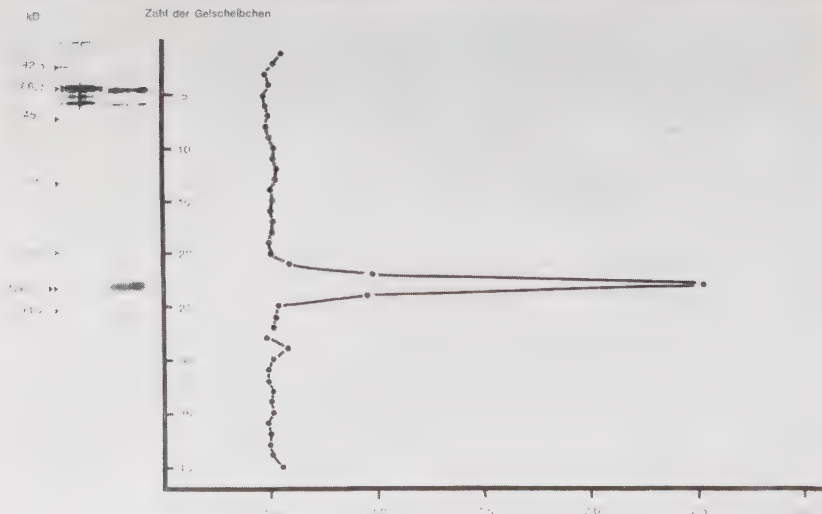
Bestimmung des HBeAg-Gehalts der Einzelfraktionen der Elution aus dem SDS-Gel. Dazu wurden 200µl Aliquots mit 400µl Verdünnungspuffer versetzt, um die vorhandene Konzentration von SDS zu reduzieren. Diese verhinderte ebenso wie das in der Probe vorhandene Acrylamid eine Proteinbestimmung in den Einzelfraktionen.

Das so gewonnene HBeAg (Fraktion 20, Abbildung 16) wanderte im elektrischen Feld als eine homogene Bande bei einem RF-Wert (Relative Wanderungsstrecke) von etwa 0,6, wobei in 10 gleichartigen Experimenten ein identisches Ergebnis erhalten wurde. Die eluierte Proteinmenge war jedoch zu gering, um Proteinbestimmungen nach Lowry (Lowry et al., 1951) oder Warburg (Warburg, 1948) durchführen zu können.

#### IV.4: Kontrolle der elektrophoretischen Reinheit des eluierten HBeAg durch analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese:

Um die Effizienz der halbpräparativen Gelelektrophorese zu überprüfen, wurden alle Eluate der HBeAg-positiven Fraktionen durch Gefriertrocknung konzentriert, und ein Aliquot erneut der Analyse im analytischen SDS-Gel unterworfen. Abbildung 17 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

Abbildung 17: Analyse der elektrophoretischen Reinheit von HBeAg :



Darstellung des Testergebnisses der aus dem Gel eluierten HBeAg-Aktivität des gereinigten Materials. Parallel ist ein durch Silber gefärbter Gelstreifen desselben Experiments abgebildet. Neben dem Protein mit dem Molekulargewicht und der Aktivität des HBeAg konnte kein weiteres Protein nachgewiesen werden. Die Banden im höheren Molekulargewichtsbereich sind auch in der Kontrolle ohne Protein sichtbar und als Artefakte zu betrachten.

Durch Vergleich der Wanderungsstrecke von mitgeführten Proteinmarkern mit der Probe wurde das Molekulargewicht von HBeAg mit etwa 17000 D bestimmt. Dieses Molekulargewicht stellt einen Mittelwert der Auswertung von 10 gleichartigen Experimenten dar, wobei die Standardabweichung der Einzelbestimmungen vom Mittelwert unter 10% lag.

#### IV.5: Bilanz der Reinigung von HBeAg aus menschlichem Plasma:

Zur Bilanzierung des Reinigungsvorgangs wurden 3 Parameter herangezogen:

1. Das Verhältnis Menge des HBeAg zur Menge des gemessenen Proteins.
2. Der sich aus 1. errechnende Anreicherungsfaktor.
3. Die Ausbeute, d.h. der verbleibende Betrag an HBeAg-Aktivität im Verlauf der Reinigungsschritte.

Tabelle 12: Übersicht über die Reinigungsschritte zur Isolierung von HBeAg aus menschlichem Plasma auf dem hier gezeigten Weg:

|                                            | cpm/mg<br>Gesamtprotein | Anreicherungs-<br>faktor | Ausbeute<br>(%) |
|--------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|
| Plasma:                                    | $1,4 \times 10^5$       | 1                        | 100             |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -<br>fällung: | $2,7 \times 10^5$       | 1,93                     | 100             |
| Phenylsepharose: (siehe Abbildung 12)      |                         |                          |                 |
| Pool 1:                                    | $5,2 \times 10^6$       | 37                       | 10              |
| Pool 2:                                    | $1,5 \times 10^7$       | 107                      | 12              |
| Pool 3:                                    | $2,5 \times 10^7$       | 179                      | 2               |
| IEF im                                     |                         |                          |                 |
| granulierten Gel:                          | $5 \times 10^8$         | 3000*                    | 0,5             |
| SDS-PAGE                                   |                         |                          |                 |
| (semipräparativ):                          | $3 \times 10^9$         | 20000*                   | 0,1             |

\*Diese Werte wurden grob kalkuliert, da aufgrund der geringen Menge von

verbliebenem HBeAg die Proteinmenge mit den üblichen Verfahren nicht mehr bestimmt werden konnte. Deshalb mußte in diesen Fällen auf die Anfärbbarkeit des HBeAg mit Hilfe der Silberfärbung zurückgegriffen werden. Dabei wurde die Farbintensität der mit Silber angefärbten Probe mit der der titrierten Markerproteine verglichen. Aus diesem Grund ist bei diesen Angaben die Annahme einer Fehlerbreite von 50% gerechtfertigt.

Insgesamt wurden bei der Phenylsepharosechromatographie 8, bei der IEF 3 und bei der semipräparativen SDS-PAGE 10 Experimente berücksichtigt.

#### IV.6: Berechnung der Nachweisempfindlichkeit des HBeAg-Tests:

Betrachtet man das nach dem hier vorgestellten Verfahren gereinigte HBeAg als völlig reines Protein, dessen antigene Determinanten erhalten sind, so entsprechen  $3 \times 10^9$  cpm einem mg Protein. Da die Zählraten der Negativkontrollen im Mittel etwa 300 cpm betragen und für die positive Bewertung des Tests die 2,1-fache Zählrate der Negativkontrolle postuliert wird, kann die Nachweisgrenze des Tests mit 0,2 ng angenommen werden.

#### IV.7: SDS-Entfernung von HBeAg-positivem Material:

Um störende Einflüsse von SDS auf die zur weiteren Charakterisierung eingesetzten Reaktionen auszuschalten, wurden mehrere Verfahren ausprobiert.

Eine Präzipitation mit TCA gelang nicht, da HBeAg zugleich mit dem SDS bis zu einer Konzentration von 50% (w/v) TCA in Lösung blieb. Aceton vermochte zwar HBeAg aus der Lösung auszufällen, präzipitierte aber auch das in Aceton schwerlösliche SDS.

Die Mikrogefäiltration in Eppendorfreaktionsgefäßen (Christopherson et al., 1979) über Biogel P-6DG führte zu einer weitgehenden Entfernung von SDS, so daß das verbleibende Material ohne Schwierigkeiten der isoelektrischen Fokussierung (Hjelmeland and Chrambach, 1981)

unterworfen werden konnte. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens war die geringe Volumenzunahme.

Aliquots von dem so gereinigten Material wurden zur näheren Charakterisierung des HBeAg folgenden Untersuchungen unterworfen:

1. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung (ohne vorherige SDS-Entfernung).
2. Isoelektrische Fokussierung.
3. CNBr-Spaltung.
4. Spaltung mit  $V_8$ -Protease aus *Staphylococcus aureus*.

#### IV.8: Aminosäurenbruttozusammensetzung des gereinigten HBeAg:

Nach Dialyse und Konzentrieren wurden 1,5µg dieses Materials (Fraktion 20, Abbildung 16) hydrolysiert und der Aminosäureanalyse unterworfen. Tabelle 13 zeigt die Aminosäurenbruttozusammensetzung des so gewonnenen HBeAg im Vergleich mit der aus der DNA-Sequenz des HBV Subtyp adw ermittelten und der von Takahashi et al. (1983) bestimmten Zusammensetzung.

Tabelle 13: Aminosäurenbruttozusammensetzung des gereinigten HBeAg:  
(Angaben in Mol%)

| Aminosäure     | HBeAg<br>ermittelt aus<br>der DNA-Sequenz | HBeAg<br>AS-analyse<br>Takahashi | HBeAg<br>gereinigt in<br>dieser Studie |
|----------------|-------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|
| Asparaginsäure | 9,3                                       | 7,8                              | 11,5                                   |
| Threonin       | 7,0                                       | 5,9                              | 5,9*                                   |
| Serin          | 6,2                                       | 9,6                              | 7,6*                                   |
| Glutaminsäure  | 8,7                                       | 8,7                              | 11,6                                   |
| Prolin         | 7,4                                       | 8,1                              | 5,3                                    |
| Glycin         | 2,8                                       | 7,7                              | 3,4**                                  |
| Alanin         | 4,8                                       | 6,7                              | 4,6                                    |
| Cystein        | 2,0                                       | -                                | -                                      |
| Valin          | 6,9                                       | 7,2                              | 7,8                                    |
| Methionin      | 2,4                                       | 1,6                              | 2,2*                                   |
| Isoleucin      | 4,2                                       | 4,1                              | 4,1                                    |
| Leucin         | 14,8                                      | 14,5                             | 14,4                                   |
| Tyrosin        | 4,9                                       | 2,7                              | 1,3*                                   |
| Phenylalanin   | 6,2                                       | 4,6                              | 6,0                                    |
| Histidin       | 3,3                                       | 2,7                              | 4,7                                    |
| Lysin          | 1,6                                       | 2,4                              | 3,4                                    |
| Arginin        | 7,5                                       | 5,7                              | 6,4                                    |
| Tryptophan     | nd                                        | nd                               | nd                                     |

nd= nicht bestimmt

Institut für Hämatologie der GSF, Prof. Dr. Eulitz

\* diese Werte wurden um 10% des erhaltenen Wertes erhöht, um die während der Hydrolyse stattfindenden oxidativen Verluste auszugleichen.

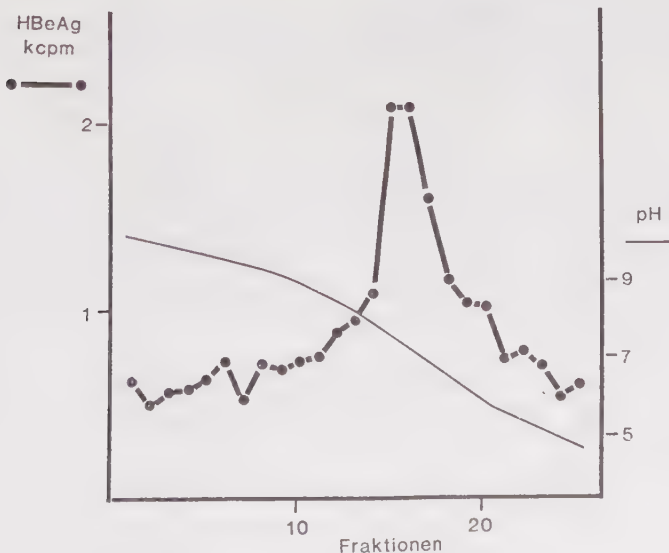
\*\* dieser Wert wurde rückinterpoliert auf den erwarteten Glycingehalt, da der erhaltene Wert, wahrscheinlich bedingt durch Reste von

TRIS-Glycin-Puffer, ca. 10-fach höher lag. Ein hoher Glycingehalt war auch in eluiertem Material aus einem nicht proteinhaltigen Kontrollgelstückchen nachweisbar.

#### IV.9: Bestimmung des isoelektrischen Punktes von HBeAg:

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes des HBeAg wurde mit einem Aliquot des gereinigten HBeAg (Fraktion 20, Abbildung 16) im Polyacrylamidflächgel durchgeführt. Nach der Fokussierung wurde der pH-Gradient im Gel mit einer Flachbodenelektrode bestimmt, das Gel in einzelne Stückchen zerteilt (2x7mm) und Protein eluiert. Im HBeAg-RIA wurde anschließend das Eluat auf Antigengehalt untersucht. Abbildung 18 zeigt das Antigenprofil der Fokussierung in Relation zum pH-Gradienten.

Abbildung 18: Bestimmung des isoelektrischen Punktes von HBeAg im analytischen Polyacrylamidflächgel:



Darstellung der Bestimmung der HBeAg-Aktivität aus den Eluaten der Einzelfraktionen nach der isoelektrischen Fokussierung. Die Ergebnisse des HBeAg-Tests sind als geschlossene Kreise dargestellt. Der Verlauf des pH-Gradienten ist durch eine dünne Linie markiert; die Anode lag während der Fokussierung auf der linken Seite des Gels. Im Gegensatz zu der Fokussierung, die in Abbildung 13 Seite 49 abgebildet ist, ließ sich das gereinigte HBeAg im Gel fokussieren und konzentrierte sich bei einem pH-Wert von 7,45. Eine Proteinbestimmung konnte wegen der geringen Menge des aufgetragenen Materials nicht durchgeführt werden.

Als isoelektrischer Punkt des HBeAg wurde das Maximum des Antigengehalts im HBeAg-RIA angesehen. Der pI des HBeAg wurde mit 7,45 bestimmt.

#### IV.10: Spaltung von HBeAg durch CNBr:

Die CNBr-Spaltung von HBeAg sollte nach der von der DNA-Sequenz des HBV abgeleiteten Primärstruktur des HBeAg bei vollständiger Spaltung theoretisch 3 Peptide erzeugen, deren Molekulargewichte in Tabelle 14 zusammengestellt sind.

Durch unvollständige Spaltung können zwei weitere Peptide (1a, 2a) entstehen, deren Molekulargewicht 11200 D und 10000 D betragen.

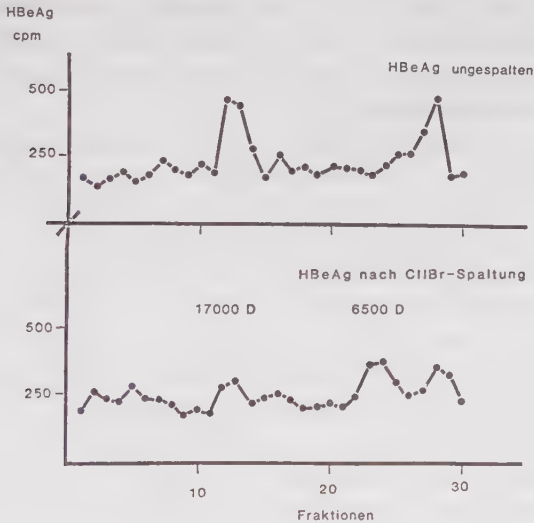
Tabelle 14: Molekulargewichte der Spaltprodukte von HBeAg nach CNBr-Behandlung:

| Bruchstück | Aminosäuren | Molekulargewicht |
|------------|-------------|------------------|
| 1          | 2 - 66      | 7800             |
| 1a         | 2 - 93      | 11200            |
| 2          | 67 - 93     | 3400             |
| 2a         | 67 - 149    | 10000            |
| 3          | 94 - 149    | 6600             |

Um eine Aussage über die Lage der antigenen Determinanten treffen zu können, wurde gereinigtes HBeAg wie beschrieben mit CNBr gespalten und im analytischen SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde in 3 mm breite Streifen geschnitten, daraus die aufgetrennten Proteine eluiert, und die Menge des vorhandenen HBeAg quantitativ durch RIA bestimmt. Das erhaltene Profil ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Während der

Spaltung entstand im Vergleich zum ungespaltenen Molekül ein Bruchstück mit einem Molekulargewicht von etwa 6500 D, das antigene Eigenschaften zu haben scheint. Das Auftreten dieses Fragments konnte bei zwei Wiederholungen des Versuchs bestätigt werden.

Abbildung 19: Ergebnis des HBeAg-Tests vor und nach Spaltung von HBeAg mit CNBr:



Dargestellt ist ein Ergebnis der Spaltungen mit CNBr, die alle ein ähnliches Muster ergaben. Im Gegensatz zum ungespaltenen Material (oben) wird nach CNBr-Spaltung (unten) ein neues Aktivitätsmaximum sichtbar, das mit einem Molekulargewicht von etwa 6500 D wandert. Der verbliebene Aktivitätsgipfel bei einem Molekulargewicht von 17000D deutet im unteren Bild auf eine nicht vollständige Spaltung hin. Ein Aktivitätsanstieg am Ende des Gels (rechts) wurde in allen Versuchen beobachtet und ist als Artefakt zu betrachten, während die höhere Aktivität am Gelanfang wahrscheinlich von denaturiertem Material herrührt.

#### IV.11: Behandlung von HBeAg mit Protease V8:

Die Behandlung von HBeAg mit Protease V 8 führte nicht zu einem Auftreten von Spaltprodukten, obwohl zur Digestion verschiedene Zeiten (1 bis 24h, 37°C) und verschiedene Enzymkonzentrationen (Enzym/Proteinverhältnis 1:5 bis 5:1) verwendet wurden. Das erhaltene Profil nach SDS-Gelelektrophorese entsprach dem der Kontrolle.

# V: Diskussion:

Aus dem Plasma eines chronischen Trägers von HBeAg konnte mit Hilfe der Ammoniumsulfatpräzipitation, der Chromatographie an Phenylsepharose, einer präparativen Isoelektrofokussierung und einer halbpräparativen SDS-Gelelektrophorese ein Protein isoliert werden, das folgende Eigenschaften hat: es wandert in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese als homogene Bande mit dem Molekulargewicht 17000D, besitzt hohe immunologische HBeAg-Aktivität (Bindung von  $3 \times 10^9$  cpm  $^{125}\text{J}$ -anti-HBe/mg Protein) ohne HBcAg-Aktivität zu zeigen und hat einen isoelektrischen Punkt bei 7,45.

Das nach der DNA-Sequenz errechnete Molekulargewicht des HBeAg beträgt etwa 16800 D, das von Takahashi et al. (1983) durch SDS-Gelelektrophorese bestimmte betrug 15500 D. Das Molekulargewicht des hier isolierten Proteins stimmt somit gut mit dem erwarteten Wert überein, auch wenn der Meßfehler in dem verwendeten System mit etwa 10% angenommen werden muß. Jedoch wurde durch wiederholte Elektrophoresen ein um 17000 D schwankender Wert erhalten; die durch Silberfärbung darstellbare Bande war identisch mit der gesamten HBeAg-Aktivität (siehe Abbildung 17). In Gegenwart von SDS und 2-Mercaptoäthanol ließen sich keine weiteren Banden oder Aktivitäten nachweisen.

Da derzeit kein Serum zur Verfügung steht, das als einzigen Antikörper gegen die Proteine des HBV anti-HBe enthält, sondern nur Seren, die die Antikörperkombination anti-HBc + anti-HBe aufweisen, kann ein darauf aufgebauter Radioimmuntest sowohl HBeAg als auch HBcAg nachweisen. Ist das Vorhandensein von freiem HBcAg im Serum in Gegenwart hoher Titer von anti-HBc auszuschließen, muß im Verlauf der Reinigung von HBeAg die Abwesenheit von HBcAg mittels eines für HBcAg spezifischen Tests geprüft werden. Im Verlauf dieser Arbeit konnte freies HBcAg im Probenmaterial weder auf immunologischem (Tabelle 3) noch auf dem Weg der Molekulargewichtsbestimmung (Molekulargewicht ca. 19kD) nachgewiesen werden.

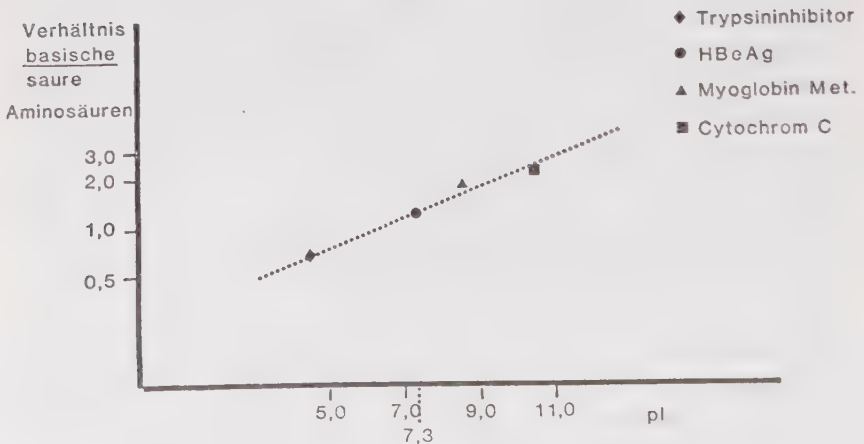
Da bei dem durch die 4-Schrittmethode isolierten Protein eine Proteinbestimmung mit den üblichen Verfahren wie der Messung der Extinktionsdifferenz bei 280 und 260nm oder der Methode nach Lowry et al. (1951) wegen der geringen Menge des vorhandenen Materials nicht

möglich war, wurde die Anfärbbarkeit mit dem Silberreagenz als Meßmethode herangezogen (Poehling und Neuhoﬀ, 1981). Bei Anwendung dieser Methode sollten die gleichen Einschränkungen gelten, wie bei der Anfärbbarkeit von Proteinen mit der Coomassie-Blaufärbung, so daß der bestimmte Wert nur als Anhaltswert zu betrachten ist. Der berechnete Anreicherungsfaktor beträgt 20000. Er kann aber aufgrund der diskutierten Meßungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung auch nur halb so groß sein. Takahashi et al. (1983) bestimmten den Anreicherungsfaktor ihres Präparats mit etwa 3000. Der von Takahashi verwendete Test war ein passiver Hämagglutinationstest, der wesentlich unempfindlicher ist als der hier benutzte radioimmunologische Nachweis. Da bei beiden Testverfahren nur Antigentiter und keine Absolutmengen bestimmt werden, sind die erzielten Reinigungsparameter schwer vergleichbar. Deshalb sagt der Anreicherungsfaktor von 20000 nicht aus, daß das in dieser Arbeit gewonnene Material höher angereichert worden ist.

Eine weitere Methode, mit der ein Protein charakterisiert werden kann, ist die Wanderung im elektrischen Feld in Gegenwart von Ampholyten. Proteine, die sich durch geringe Ladungsunterschiede auszeichnen, können mit dieser Methode getrennt werden; ein Protein, das keine Zuckermoleküle trägt, kann durch den isoelektrischen Punkt charakterisiert werden (Righetti and Drysdale, 1975). Entsprechend des Aktivitätsmaximums im Polyacrylamidgel konnte für das HBeAg ein isoelektrischer Punkt von 7,45 bestimmt werden (siehe Abbildung 18). Vergleichsdaten von anderen Autoren mit hochangereichertem HBeAg fehlen bis heute. Wird jedoch ausgehend von der Aminosäurenbruttozusammensetzung der Quotient von sauren und basischen Aminosäuren von Pferdeherzcytochrom C (Dayhoﬀ, 1972), Myoglobin (Dautrevaux and Boulanger, 1967) und Sojabohnen-Trypsininhibitor (Dayhoﬀ, 1972) errechnet und in Relation zum isoelektrischen Punkt dieser Proteine gesetzt (Malamud and Drysdale, 1978; Righetti et al., 1981), dann ergibt sich eine Gerade, die für die theoretische Bestimmung des isoelektrischen Punktes des HBeAg geeignet ist. Der Quotient von basischen zu sauren Aminosäuren beim HBeAg errechnete sich mit 1,13, woraus sich ein pI von 7,3 ergibt, wie in Abbildung 20 dargestellt ist.

Dieses Verfahren zeigt, daß der theoretisch bestimmte dem im Experiment ermittelten Wert des isoelektrischen Punktes ähnlich ist, und stellt einen weiteren Hinweis für die Reinheit des gewonnenen Materials dar, da HBeAg wegen seiner hohen Haftfähigkeit an anderen Plasmaproteinen nicht in deren Gegenwart an seinem isoelektrischen Punkt fokussiert werden kann. In diesem Fall läßt sich HBeAg über einen mehrere pH-Stufen umfassenden Bereich nachweisen (Abbildung 14, Seite 55), wobei von Howard und Zuckerman (1979) das Maximum der Antigenaktivität bei pH 4,9 nachgewiesen wurde. Fokussiert man aber HBeAg-haltiges Plasma in Gegenwart von 8M Harnstoff (Olsson and Laas, 1981; Creighton, 1979) wird das Maximum der HBeAg-Aktivität bei einem pH von 5,5 nachgewiesen. Auch in diesem Fall ist HBeAg über einen pH-Bereich von mehr als einer Stufe nachweisbar.

Abbildung 20: Berechnung des isoelektrischen Punktes von HBeAg durch die Aminosäurenquotientenmethode:



Darstellung der Verhältnisse basischer und saurer Aminosäuren (Ordinate) von Markerproteinen im Vergleich zu ihrem isoelektrischen Punkt (Abszisse). Die resultierende Gerade erlaubt eine theoretische Festimmung des isoelektrischen Punktes von HBeAg bei 7,3.

Wird die Aminosäurenbruttozusammensetzung des hier isolierten HBeAg mit der von Takahashi et al. (1983) und der aus der DNA-Sequenz errechneten verglichen, dann zeigen sich nur geringe Unterschiede in den 3 Bestimmungen (siehe Tabelle 13). Dabei muß berücksichtigt werden, daß bei der Analyse von 1,5 µg Material - entsprechend weniger als 0,1 nM - an der Grenze der Auflösbarkeit gearbeitet wurde. Durch Reste von TRIS-Glycin-Puffer oder Acrylamid bedingt traten oxidative Verluste auf, die besonders die labilen und in geringen Konzentrationen vorhandenen Aminosäuren Cystein und Tyrosin betrafen. Es ist daher anzunehmen, daß Cystein auch in dem hier isolierten Material vorhanden ist, obwohl es nicht nachgewiesen werden konnte. Der hohe Glycingehalt der Probe ist ein Hinweis dafür, daß die durchgeführte Dialyse nicht vollständig war. Die weitgehende Übereinstimmung der Aminosäurenbruttozusammensetzung mit den erwarteten Werten kann als weiteres Kriterium dafür dienen, daß das isolierte HBeAg mit anderen Proteinen nicht oder wenn, nur ganz unwesentlich verunreinigt ist.

Die Einwirkung von CNBr auf das hochgereinigte HBeAg führte zur Spaltung des Moleküls, was aus der Verminderung des ursprünglichen Antigenpeaks geschlossen werden kann. Dabei tritt ein Spaltprodukt auf, das im SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 6500 D aufweist und in geringer Konzentration im RIA nachgewiesen werden kann. Da die zweimalige Wiederholung dieses Experiments identische Ergebnisse brachte, scheint es zulässig zu unterstellen, daß das hierbei gebildete Peptid mit dem theoretisch ermittelten C-terminalen Peptid, Molekulargewicht 6600 D, identisch ist.

Nach den Untersuchungen von Atassi (1980) sind die antigenen Determinanten von Proteinen wie Myoglobin, Lysozym, Cytochrom c, und Tabakmosaik-Virus-Hüllprotein auf hydrophilen Regionen des Moleküls lokalisiert, nach den Ergebnissen von Blum et al. (1984) sind sie beim HBsAg zusätzlich an Cystein und Lysin gebunden. Behandlung des HBeAg mit SDS und 2-Mercaptoäthanol stört nicht die Erkennungsreaktion mit dem entsprechenden Antikörper und schließt somit eine komplexe Tertiärstruktur für die antigenen Determinanten aus (Sternberg and Thornton, 1978). In dem C-terminalen durch CNBr-Spaltung erhaltenen Peptid sind hydrophile Aminosäuren, einschließlich einem Cystein- und einem Lysinrest vorhanden, wodurch das Gesamtpeptid hydrophil erscheint.

einem Lysinrest vorhanden, wodurch das Gesamtpeptid hydrophil erscheint (siehe Abbildung 4). Wenn der C-terminale Anteil dieses Peptids (z.B. die Sequenz 127-140) eine ausschließlich gegen HBeAg gerichtete antigene Determinante trägt, dann ist auch zu erklären, warum ein gegen HBeAg gerichteter Antikörper HBcAg nicht zu erkennen vermag, da dieses durch das Vorhandensein der vielen Argininreste eine andere Konformation haben sollte und für anti-HBe nicht zugänglich ist. Behandlung des HBcAg mit SDS und 2-Mercaptoäthanol ändert dessen Tertiärstruktur so, daß am nun entfalteten Molekül der Bereich frei wird, an den anti-HBe binden kann, die HBc-Antigenität geht dabei verloren (Ohori et al., 1980; MacKay et al., 1981). Nur die Änderung der Tertiärstruktur kann erklären, warum auf einem Molekül zwei verschiedene Antigenspezifitäten lokalisiert sind.

Wie die Ergebnisse zeigen führt das beschriebene Reinigungsverfahren zur Isolierung von HBeAg, welches verglichen mit den bekannten Angaben in der Literatur und unter Berücksichtigung gültiger Kriterien rein zu sein scheint.

Der erste Schritt der Ammoniumsulfataussalzung führt zu einem Verlust des größten Teils von Albumin (Green and Cori, 1943; Cohn et al., 1947; Baranowski and Niederland, 1949); dieser Schritt wurde auch von Takahashi beschrieben (Takahashi et al. 1980). Bei dem zur Reinigung benutzten Plasma erwies sich die fraktionierte Präzipitation als nicht praktikabel, da HBeAg bereits bei 25% Sättigung in erheblichem Umfang aus der Lösung ausgefällt wurde. Eine Abtrennung von IgG konnte auf diesem Weg nicht erreicht werden.

Die Chromatographie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit Phenylsepharose erwies sich als ein Verfahren, mit dem große Mengen von Plasma aufgearbeitet werden konnten, da die Konzentration des mit Sepharose gekoppelten Liganden 40 µM/ml Gelbett betrug (Rosengren et al., 1975), woraus sich für menschliches Serumalbumin eine Bindungskapazität von etwa 15 mg/ml Gelbett ergibt. Der erzielte Anreicherungseffekt war ausreichend.

Alle übrigen gängigen säulenchromatographischen Verfahren mußten aufgrund der auftretenden hohen Verluste oder wegen der mangelhaften Reinigungswirkung aufgegeben werden. Hierzu gehörten:

-Affinitätschromatographie der Immunglobuline des Plasmas an Protein A-Sepharose. HBeAg bindet in diesem Fall zu einem hohen Prozentsatz an das Gel und wird zugleich mit dem IgG durch 3M Kaliumthiocyanatlösung eluiert. Dabei scheint HBeAg durch sein Haftvermögen an IgG unspezifisch gebunden zu werden.

-Affinitätschromatographie an DEAE-Affigel blue. HBeAg wird von diesem Gelmaterial gebunden und nicht mit der Masse des IgG ausgewaschen. Es wird aber bei einer Salzkonzentration im Elutionspuffer eluiert, bei der das gebundene Albumin zurückgehalten wird, nicht aber das weniger stark gebundene IgG.

-Austauschchromatographie an Lysin- und Heparinsepharose (Einarsson et al., 1978; McKay and Laurell, 1980). Hierbei zeigte HBeAg keine Tendenz spezifisch zu binden, woraus auf ein Fehlen von Wechselwirkungen positiver Ladungsträger des Proteins mit der Matrix geschlossen werden kann.

-Gelfiltration über Sephadex G150, Sephacryl S200, Biogel P150 bzw. P30. Auch in Gegenwart von nichtionischen Detergentien wie Octylglucopyranosid, NP40 oder beidem kombiniert ebenso wie mit 6M Harnstoff wurde keine ausreichende Reinigungswirkung erzielt.

Entweder führten diese Verfahren nicht zu einer ausreichenden Dissoziation des HBeAg von den Begleitproteinen oder das HBeAg wurde abdissoziiert und blieb auf der Gelmatrix, während die Begleitproteine eluiert wurden. Ein Ablösen des HBeAg von der Gelmatrix war auch durch Inkubation mit 1% SDS bei hohen Temperaturen nicht möglich. Ob die früher beschriebene proteolytische Aktivität innerhalb der Dane-Partikelcores auch bei HBeAg-haltigem Material für den hohen Verlust mitverantwortlich war (Albin und Robinson, 1980), konnte nicht geklärt werden.

Das Haftvermögen des HBeAg an anderen Proteinen führte dazu, daß dieses Protein früher der DNA-Polymerase zugeordnet wurde (Melnick et al. 1976), dem IgG (Neurath und Strick, 1977; 1979b; Fields et al., 1978; Takahashi et al., 1978; Tedder und Bull, 1979; Katz et al., 1980; Blanchy et al., 1980; Takahashi et al., 1980) und der Lactodehydrogenase (Vyas et al., 1977). Aus diesem Grund dürfte es auch bei früheren Untersuchungen nicht möglich gewesen sein, den isoelektrischen Punkt zu

bestimmen.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Budkowska wird das Molekulargewicht des HBeAg mit 40000 D bzw. 45000 D angegeben (Budkowska et al., 1984). Für die Erklärung dieses hohen Molekulargewichts kann sowohl ein Dimerisierungseffekt (Budkowska et al., 1984), als auch ein Haften an einem anderen Protein diskutiert werden. Eine Antigenitätsbestimmung im Gel wurde mit diesem Protein nicht durchgeführt.

Das ungewöhnliche Haftvermögen dieses Proteins hat eine generelle Prozedur zur Reinigung von HBeAg bisher verhindert (Weil et al., 1979; Ferus und Tedder, 1984). So wurden in dieser Arbeit als weitere Reinigungsschritte die arbeitsaufwendigen und verlustreichen Verfahren der isoelektrischen Fokussierung im granulierten Gel und der halbpräparativen Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet. Letztere Methode mußte auch von Takahashi et al. (1983) angewendet werden, um ein reines HBeAg herstellen zu können. Wie das Bild der zweidimensionalen Gelelektrophorese zeigt, können verschiedene Proteine mit den Molekulargewichten zwischen 15000D und 17000D durch das Verfahren der isoelektrischen Fokussierung aufgetrennt werden (siehe Abbildung 13). Wie das Profil der Elution von Proteinen und HBeAg aus dem IEF-Gel zeigt (siehe Abbildung 14), geht bei diesem Reinigungsschritt der größte Teil des HBeAg durch das Haftvermögen an anderen Proteinen verloren. Einer etwa 20-fachen Anreicherung steht ein ca. 95%-iger Verlust an HBeAg gegenüber (siehe Tabelle 12).

So bleibt abschließend zur Beurteilung der Reinigungsschritte festzustellen, daß diese wohl zu einem hochangereicherten HBeAg führen, daß die Endausbeute aber nicht zufriedenstellend ist.

Schon vor 5 Jahren wurden DNA-Sequenzen, die für die Proteine des Hepatitis-B-Virus codieren, in E.coli kloniert (Pasek et al., 1979; Charnay et al., 1979; Burrell et al., 1979; Sninsky et al., 1979; Murray et al., 1981; Stahl et al., 1982). MacKay et al. (1981) konnten die Umwandlung von HBcAg in HBeAg an diesem klonierten Material zeigen. Es ist daher zu diskutieren, ob zukünftig der Weg, über gentechnisch synthetisiertes Material zu einem reinen HBeAg zu gelangen, einfacher ist, als dieses aus dem Serum oder Plasma von Patienten zu isolieren.

Gough und Murray ist es 1982 gelungen durch Transfektion von HBV-DNA in eine Rattenzelllinie, Expression von HBeAg zu erreichen. Wenn auch die Menge des in den Zellkulturüberstand abgegebenen HBeAg gering ist, steht hiermit dennoch eine weitere mögliche Antigenquelle zur Verfügung. Serrano und Hirschman gelang es, 1984 durch die Transfektion zirkulärer HBV-DNA in Rattenzellen eine höhere Ausbeute an synthetisiertem HBeAg zu erreichen. Durch Konzentrieren der Zellkulturüberstände konnten sie im SDS-PAGE eine Bande mit HBeAg-Aktivität nachweisen. Der Beweis, daß diese Bande reines HBeAg darstellt, steht jedoch aus, da HBeAg durch den Radioimmunoassay über einen größeren Bereich nachgewiesen wurde, im Gel aber nur eine schmale Bande sichtbar war.

Offen bleibt weiterhin die Frage nach der Funktion von HBeAg und HBeAg. Ob diese Proteine den Zellstoffwechsel beeinflussen und welche Rolle sie bei der Virusreplikation spielen, kann erst dann beantwortet werden, wenn beide Proteine in genügender Menge für diese Untersuchungen zu Verfügung stehen.

Durch die in dieser Arbeit beschriebene Reinigungsmethode sollte es jedoch möglich sein, HBeAg in ausreichendem Umfang dafür zu isolieren. Durch die Darstellung synthetischer Peptide von Epitopen des HBeAg sollte es gelingen, in geeigneten Versuchstieren gegen sie hochaffine monospezifische Antikörper zu erzeugen. Nach den Rückschlüssen auf Seite 70 scheint hierfür die Sequenz der Aminosäuren 127 - 140 ein geeigneter Kandidat zu sein.

# VI: Zusammenfassung:

HBV ist ein menschliches Hepadnavirus und führt zu akuten, chronischen und manchmal neoplastischen Erkrankungen der Leber. Bisher sind drei virale Antigene identifiziert worden, eines (HBsAg) bildet in polymerer Form die Oberfläche des Virus, das andere (HBcAg) baut als Strukturantigen den Kern des Viruspartikels auf. Dieses Antigen wird offenbar durch Serumproteasen in vivo so modifiziert, daß im Serum von Patienten nur HBeAg nachgewiesen werden kann.

Durch Kombination von vier Reinigungsmethoden gelang es, HBeAg zu isolieren: dies waren Ammoniumsulfatpräzipitation, Chromatographie an Phenylsepharose, IEF im granulierten Gel und halbpräparative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Durch Anwendung dieses Reinigungsverfahrens erreicht man eine Anreicherung des HBeAg im Verhältnis zum Ausgangsmaterial von etwa 1 : 20000. Dabei muß allerdings eine Ausbeute von unter 1% hingenommen werden.

Im SDS-PAGE kann HBeAg als homogene Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 17000 D durch Silberfärbung sichtbar gemacht werden. In dieser Bande ist zugleich die gesamte nachweisbare HBeAg-Aktivität lokalisiert. Die Aminosäurezusammensetzung des so erhaltenen Materials zeigt große Ähnlichkeit mit der aus der DNA-Sequenz berechneten. Der isoelektrische Punkt des HBeAg wurde mit 7,45 bestimmt.

Während die Behandlung von HBeAg mit Protease V8 nicht zu einer Spaltung des HBeAg führt, erzeugt die Umsetzung mit CNBr mehrere Peptide. Eines mit dem Molekulargewicht von etwa 6500 D scheint die antigene Determinante für das verwendete anti-HBe zu tragen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS:

Albin, C. and Robinson, W.S., (1980) Protein kinase activity in hepatitis B virus.

J. Virol. 34, 297 - 302

Alexander, H. and Lerner, R.A., (1984) Chemically synthesized peptide analogues of the hepatitis B surface antigen.

In: Advances in Hepatitis Research (Chiarsi, F.V., ed) Masson Publ. Inc., New York, pp. 223 - 229

Allen, R.C., (1980) Rapid isoelectric focusing and detection of nanogram amounts of proteins from body tissues and fluids.

Electrophoresis 1, 32 - 37

Almeida, J.D., (1978) Visual aspects of hepatitis B antigen.

J. Med. Virol. 3, 13 - 15

Alter, H.J., Seeff, L.B., Kaplan, P.M., McAuliffe, V.J., Wright, E.C., Gerin, J.L., Purcell, R.H., Holland, P.V. & Zimmermann, H.J., (1976) Type B hepatitis; the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needlestick exposure.

N. Engl. J. Med. 295, 909 - 913

Ames, G.F.L. and Nikaido, K., (1976) Two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins.

Biochemistry 15, 616 - 623

Anderson, N.L. and Anderson, N.G., (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5421 - 5425

Anderson, N.G. and Anderson, N.L., (1978) Analytical techniques for cell fractions. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple isoelectric focusing.

Anal. Biochem. 85, 331 - 340

Atassi, M.Z., (1980) Precise determination of protein antigenic structures has unravelled immune recognition of proteins and provided a prototype for synthetic mimicking of other protein binding sites.

Mol. Cell. Biochem. 32, 21 - 43

Baranowski, T. and Niederland, T.R., (1949) Aldolase activity of myogen A.

J. Biol. Chem. 180, 543 - 551

Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J. & Vyas, G.N., (1982) Immune response to synthetic peptide analogues of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 4400 - 4404

Blakesley, R.W. and Boezi, J.A., (1977) A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G 250.

Anal. Biochem. 82, 580 - 582

Blanchy, B., Hank, O., Vitritski, L. & Trepo, C., (1980) Two low molecular weight peptides as common determinants to different molecular forms and specificities of hepatitis B e antigen.

J. Med. Virol. 5, 39 - 46

Blum, H.E., Figus, A., Bhatnagar, P.K. & Vyas, G.N., (1984) Immunochemistry of hepatitis B surface antigen and molecular pathogenesis of chronic liver disease.

In: Advances in hepatitis research, ( Chiarsi, F.V., ed) Masson Publ. Inc., New York, pp. 69 - 79

Blumberg, B.S., Alter, H.J. & Visnich, S.A., (1965) A "new" antigen in leukemia sera.

J. Am. Med. Assoc. 191, 541 - 546

Blumberg, B.S. (1977) Australia antigen and the biology of hepatitis B. Science 197, 17 - 25

Bonino, F., Hoyer, B., Nelson, J., Engle, R., Verme, G. & Gerin, J., (1981) Hepatitis B virus DNA in the sera of HBsAg carriers: a marker of active hepatitis B virus replication in liver.

Hepatology 1, 386 - 391

Budkowska, A., Shih, J.W. & Gerin, J.L., (1977) Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen (HBcAg).

J. Immunol. 118, 1300 - 1305

Budkowska, A., Kalinowska, B. & Nowoslawski, A., (1979) Identification of two HBcAg subspecificities revealed by chemical treatment and enzymatic digestion of liver derived HBc Ag.

J. Immunol. 123, 1415 - 1416

Budkowska, A., Petit, A., Karkowska, S. & Roszuk, D., (1984) Isolation and characterization of liver-derived hepatitis B e antigen.

J. Med. Virol. 13, 269 - 279

Burrell, C.J., MacKay, P., Greenaway, P.J., Hofschneider, P.H. & Murray, K., (1979) Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR 322.

Nature 279, 43 - 47

Butler, J.E., (1980) Antibody-antigen and antibody-hapten reaction.

In: Enzyme Immunoassay, (Maggio, E.T., ed) CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, pp. 5 - 52

Chairez, R., Steiner, S., Melnick, J.L. & Dreesman, G.R., (1973) Glycoproteins associated with hepatitis B antigen.

Intervirology 1, 224 - 228

Charnay, P., Pourcel, C., Louise, A., Fritsch, A. & Tiollais, P., (1979) Cloning in *Escherichia coli* and physical structure of hepatitis B virion DNA.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 2222 - 2226

Chou, P.Y. and Fasman, G.D., (1974) Conformational parameters for aminoacids in helical, beta-sheet, and random coil regions calculated from proteins.

Biochemistry 13, 211 - 222

Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1974) Prediction of protein conformation. Biochemistry 13, 222 - 245

Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978) Empirical predictions of protein conformation.

Ann. Rev. Biochem. 47, 251 - 276

Christopherson, R.I., Jones, M.E., & Finch, L.R., (1979) A simple centrifuge column for desalting protein solutions.

Anal. Biochem. 100, 184 - 187

Chu, R.C.L. and Yasunobu, K.T., (1964) The reaction of cyanogen bromide and N-bromosuccinimide with some cytochromes C.

Biochem. Biophys. Acta 89, 148 - 149

Cohen, G.H., Diezschold, B., Ponce de Leon, M., Long, D., Golub, E., Varrichio, A., Pereira, L. & Eisenberg, R.J., (1984) Localization and synthesis of an antigenic determinant of herpes simplex virus glycoprotein D which stimulates the production of neutralizing antibody.

J. Virol. 49, 102 - 108

Cohn E.J., Hughes, W.L. & Weare, J.H., (1947) Preparation and properties of serum and plasma proteins. Crystallization of serum albumin from ethanol-water mixtures.

J. Am. Chem. Soc. 69, 1753 - 1761

Cone R.E. and Marchalonis, J.J., (1974) Surface proteins of thymus - derived lymphocytes and bone-marrow derived lymphocytes.

Biochem. J., 140, 345 - 354

Couroucé, A.M., Holland, P.V., Muller, J.Y. & Soulier, J.P., (1976) HBs antigen subtypes. Proceedings of the International Workshop of HBs antigen subtypes.

In: Bibl. Haematol., No. 42, S. Karger, Basel

Creighton, T.E., (1979) Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea.

J. Mol. Biol., 129, 235 - 264

Crumpton, M.J. and Parkhouse, R.M.E., (1972) Comparison of the effects of various detergents on antigen - antibody interaction.

FEBS - Letters 22, 210 - 212

Dane, D.S., Cameron, C.H. & Briggs, M., (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis.

Lancet, II 695 - 698

Dautrevaux, M. & Boulanger, Y., (1967) Les myoglobines.

Bull. Soc. Chim. Biol., 49, 949 - 983

Dayhoff M.O., (1972) Atlas of protein sequence and structure.

Nat. Biomed. Res. Found., Georgetown University Medical Center, Washington DC, Vol. V

Dixon, M. and Webb, E.C., (1961) Enzyme fractionation by salting out: a theoretical note.

In: Adv. in Protein Chem., Vol. 16, (Anfinsen C.B. et al., eds) Academic Press, New York, pp. 197 - 219

Dreesman, G.R., Sanchez, Y., Ionescu-Matin, I., Sparrow, J.T., Six, H.R., Peterson, D.L., Hollinger, F.B. & Melnick, J.L., (1982) Antibody to hepatitis B surface antigen after a single injection of uncoupled synthetic HBsAg peptides.

Nature 295, 158 - 160

Dulbecco, R. and Vogt, M., (1954) Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.

J. Exp. Med. 99, 167 - 199

Einarsson, M., Kaplan, L. & Utter, G., (1978) Purification of hepatitis B surface antigen by affinity chromatography.

Vox Sang. 35, 224 - 233

Eleftheriou, N., Heathcote, J., Thomas, H.C. & Sherlock, S., (1975) Incidence and clinical significance of e antigen and antibody in acute and chronic liver disease.

Lancet II, 1171 - 1173

El Sheikh, N., Woolf, J.L., Galbrait, R.M., Eddelsto, A.L., Dymock, J.W. & Williams, R., (1975) e antigen - antibody systems as indicator of liver damage in patients with hepatitis B antigen.

Brit. Med. J. 4, 252 - 253

Ferns, B. and Tedder, R.S., (1984) Monoclonal antibodies to hepatitis B e antigen (HBeAg) derived from hepatitis B core antigen (HBcAg): Their use in characterization and detection of HBe Ag.

J. Gen. Virol. 65, 899 - 908

Fields, H.A., Bradley, D.W., Davis, C.L. & Maynard, J.E., (1978) Purification and partial characterization of hepatitis B e antigen.

Infect. Immun. 20, 792 - 803

Frösner, G.G., Brodersen, M., Papaevangelou, G., Sugg, U., Haas, H., Mushahwar, I.K., Ling, C.M., Overby, L.R. & Deinhardt, F., (1978) Detection of HBeAg and anti-HBe by a sensitive radioimmunoassay.

J. Med. Virol. 3, 67 - 76

Frösner, G.G., Schomerus, H., Wiedmann, K.H., Zachoval, R., Bayerl, B., Bäcker, U., Gathof, G.A. & Sugg, U., (1982) Diagnostic significance of quantitative determination of hepatitis B surface antigen in acute and chronic hepatitis B infection.

Eur. J. Clin. Microbiol. 1, 52 - 58

Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P. & Charnay, P., (1979) Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genom (subtype ayw) cloned in *E. coli*.

Nature, 281, 646 - 650

Gianazza, E. and Righetti, P.G., (1980) Size and charge distribution of macromolecules in living systems.

J. Chromatography 193, 1 - 80

Gough, N.M. and Murray, K., (1982) Expression of the hepatitis B virus surface, core and e antigen genes by stable rat and mouse cell lines.

J. Mol. Biol. 162, 43 - 67

Goyert, S.M., Shively, J.E. & Silver, J., (1982) Biochemical characterization of a second family of human Ia molecules, HLA-DS, equivalent to murine I-A subregion molecules.

J. Exp. Med. 156, 550 - 566

Green, A.A. and Cori, G.T., (1943) Crystalline muscle phosphorylase. I. Preparation, properties, and molecular weight.

J. Biol. Chem. 151, 21 - 29

Green, A.A. and Hughes, W.L., (1955) Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents.

Meth. Enzymol. I, 67 - 90

Gross, E., (1967) The cyanogen bromide reaction.

Meth. Enzymol., Vol. XI, Enzyme Structure (Hirs, C.H.W., ed) Acad. Press, New York and London, pp. 238 - 255

Gross, E. and Witkop, B., (1961) Selective cleavage of the methionyl peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide.

J. Am. Chem. Soc. 83, 1510 - 1511

Hjelmeland, L.M. and Chrambach, A., (1981) Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: A discussion of basic concepts.

Electrophoresis 2, 1 - 11

Hjerten, S., (1976) Hydrophobic interaction chromatography of proteins on neutral adsorbents.

In: Methods of Protein Separation. Vol. II, (Catsimpoolas, N. ed)

Chapter 6, pp. 233 - 234

Howard, C.R., (1978) The detection of DNA polymerase activity in the diagnosis of HBV infection.

J. Med. Virol. 3, 81 - 86

Howard, C.R. and Zuckerman A.J., (1979) The separation and analysis of HBeAg.

J. Med. Virol. 4, 303 - 314

Hruska, J.K. and Robinson, W.S., (1977) The proteins of hepatitis B Dane particle cores.

J. Med. Virol. 1, 119 - 131

Hruska, J.F., Clayton, D.A., Rubenstein, J.L.R. & Robinson, W.S., (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction.

J. Virol. 21, 666 - 672

Imai, M., Tachibana, K., Moritsugu, Y., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1976) Hepatitis B antigen associated desoxyribonucleic acid polymerase activity and e antigen/anti-e system.

Infect. Immun. 13, 631 - 635

Imai, M., Nomura, M., Gotanda, T., Sano, T., Tachibana, K., Miyamoto, H., Takahashi, K., Toyama, S., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1982) Demonstration of two distinct antigenic determinants on hepatitis B e antigen by monoclonal antibodies.

J. Immunol. 128, 69 - 72

Jones, P.P., (1980) Analysis of radiolabeled lymphocyte proteins by one- and two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.

In: Selected methods in cellular immunology (Mishell, B.B. & Shiigi, S.M., eds)

Freeman & Co., San Francisco, pp. 412 - 440

Kaplan, P.M, Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. & Robinson, W.S., (1973) DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen.

J. Virol. 12, 995 - 1005

Katz, D., Melnick, J. & Hollinger, F.B., (1980) Characterization of HBeAg by physicochemical and immunochemical methods.

J. Med. Virol. 5, 87 - 100

Keil, B. und Sormova, Z., (Hrsg), (1965) Laboratoriumstechnik für Biochemiker.

Akad. Verlagsges. Geest und Portig, Leipzig S.378

Klotz, I.M., (1970) Comparison of molecular structures of proteins: helix content; distribution of apolar residues.

Arch. Biochem. Biophys. 138, 704 - 706

Krugman, S. and Giles, J.P., (1970) Viral hepatitis. New light on an old disease.

J. Am. Med. Assoc. 212, 1019 - 1029

Krugman, S., Giles, J.P. & Hammond, J., (1970) Hepatitis virus: Effect of heat on infectivity and antigenicity of MS-1 and MS-2 strains.

J. Infect. Dis. 122, 432 - 436

Krugman, S., Giles, J.P. & Hammond, J., (1971) Viral hepatitis, type B (MS-2 strain): studies on active immunization.

J. Am. Med. Assoc. 217, 41 - 45

Lämmli, U. K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680 - 684

Landers, T.A., Greenberg, H.B. & Robinson, W.S., (1977) Structure of hepatitis B Dane particle DNA and nature of the endogenous DNA polymerase reaction.

J. Virol. 23, 368 - 376

Layne, E., (1957) Spectrometric and turbidimetric methods for measuring proteins.

In: Adv. in Enzymology, Vol. III, (Colowick, S.P. and Kaplan, N.O., eds) Academic Press, New York, p. 447

Lerner, R.A., Green, N., Alexandre, H., Liu, F.T., Sutcliffe, J.G. & Shinnick, T.M., (1981) Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 3403 - 3407

Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193 265 - 275

Lürman, A., (1885) Eine Icterusepidemie.

Berl. Klin. Wochenschr. 22, 20 - 23

MacKay, P., Lees, J. & Murray, K., (1981) The conversion of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli* into e antigen.

J. Med. Virol. 8, 237 - 243

Magnius, L.O. and Espmark, J.A., (1972) New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the LeBouvier determinants.

J. Immunol. 109, 1017 - 1021

Magnius, L.O., Lindholm, A. Lundin, P. & Iwarson, S., (1975) A new antigen-antibody system. Clinical significance in long-term carriers of hepatitis B surface antigen.

J. Am. Med. Assoc. 231, 356 - 359

Malamud, D. and Drysdale, J.W., (1978) Isoelectric points of proteins: A table.

Anal. Biochem. 86, 620 - 647

Marion, P.L., Salazar, F.H., Alexander, J.J. & Robinson, W.S., (1980) State of hepatitis B viral DNA in a human hepatoma cell line.

J. Virol. 33, 795 - 806

Marion, P.L., Oshir, L., Regnery, D.C., Scullard, G.H. & Robinson, W.S., (1980) A virus in Beechey ground squirrels which is related to hepatitis B virus of man.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 77, 2941 - 2945

Mason, W.S., Seal, G. & Summers, J., (1980) Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus.

J. Virol. 36, 829 - 836

Mazzur, S., Burget, S. & Blumberg, B.S., (1974) Geographical distribution of Australia antigen determinants d, y and w.

Nature 247, 38 - 40

McKay, E.L. and Laurell, C.B., (1980) Interaction of heparin with plasma proteins. Demonstration of different binding-sites for antithrombin III - complexes and antithrombin III.

J. La. Cl. Med. 95, 69 - 80

Melnick, J.L., Dreesman, G.R. & Hollinger, F.B., (1976) Approaching the control of viral hepatitis type B.

J. Inf. Dis. 133, 210 - 215

Merril, C.R., Goldman, D. & van Keuren, M.L., (1982) Simplified silver protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels.

Electrophoresis 3, 17 - 23

Murphy, B., Tabor, E., McAuliffe, V., Williams, A., Maynard, J., Gerety, R. & Purcell, R.H., (1978) Third component HBeAg/3, of hepatitis B e antigen system identified by three different double diffusion techniques.

J. Clin. Microbiol. 8, 349 - 350

Murray, K., MacKay, P., Burrell, C.J., Schaller, H., Stahl, S. & Pasek, M., (1981) The expression of hepatitis B virus antigen genes in *Escherichia coli*.

In: Hepatitis B vaccine, 289 - 304

Mushahwar, I. K., Ling, C. M. & Overby, L. R., (1978) Studies on HBeAg and anti-HBe utilizing radiometric assay techniques.

In: Viral Hepatitis (Vyas, G. N. and Schmidt, R. eds) Franklin Institute Press, Philadelphia

Neurath, A.R. and Strick, N., (1977) Host specificity of a serum marker for hepatitis B: Evidence that e antigen has the properties of an immunoglobulin.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1702 - 1706

Neurath, A.R. and Strick, N., (1979) Association of hepatitis B e antigen (HBeAg) determinants with the core of Dane particles.

J. Gen. Virol. 42, 645 - 649

Neurath, A.R., Strick, N., Szmuness, W., Stevens, C.E. & Harley, E.J., (1979) Radioimmunoassay of hepatitis B e antigen (HBeAg):

identification of HBeAg not associated with immunoglobulins.

J. Gen. Virol. 42, 493 - 504

Neville, D.M., (1971) Molecular weight determination of protein - dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system.

J. Biol. Chem. 246, 6328 - 6334

Nielsen, J.O., Dietrichson, O. & Juhl, E., (1974) Incidence and meaning of the "e" determinant among hepatitis B antigen positive patients with acute and chronic liver disease.

Lancet II, 913 - 915

Norkrans, G., Frösner, G.G. & Iwarson, S., (1979) Determination of HBeAg by radioimmunoassay: prognostic implications in hepatitis B.

Scand. J. Gastroenterol. 14, 289 - 293

O'Connell, A.P., Urban, M.K. & London, W.T., (1983) Naturally occurring infection of Pekin duck embryos by duck hepatitis B virus.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 1703 - 1706

O'Farrell, P.W., (1974) High resolution two - dimensional electrophoresis of proteins.

J. Biol. Chem. 250, 4007 - 4021

Oakley, B.R., Kirsch, D.R., & Morris, N.R., (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels.

Anal. Biochem. 105, 361 - 363

Ochs, D.C., McConkey, E.H., & Sammons, D.W., (1981) Silver stains for proteins in polyacrylamide gels: A comparison of six methods.

Electrophoresis 2, 304 - 307

Ogston, C.W., Jonak, G.J., Rogler, C.E., Astrin, S.M. & Summers, J., (1982) Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinomas of woodchucks.

Cell 29, 385 - 394

Ohori, H., Onodera, S. & Ishida, N., (1979) Demonstration of hepatitis B e antigen (HBeAg) in association with intact Dane particles.

J. Gen. Virol. 43, 423 - 427

Othori, H., Yamaki, M., Onodera, S., Yamada, E. & Ishida N., (1980) Antigenic conversion from HBcAg to HBeAg by degradation of hepatitis B core particles.

Intervirology 13, 74 - 82

Othori, H., Shimizu, N., Yamada, E., Onodera, S. & Ishida, N., (1984) Immunological and morphological properties of HBe Ag subtypes (HBeAg /1 and HBeAg/2) in hepatitis B virus core particles.

J. Gen. Virol. 65, 405 - 414

Olsson, I. and Laas, T., (1981) Isoelectric focusing in agarose under denaturing conditions.

J. Chromatography 215, 373 - 378

Ono, Y., Onda, H., Sasada, R., Igarashi, K., Sugino, Y. & Nishioka, K., (1983) The complete nucleotide sequence of the cloned hepatitis B virus DNA: subtypes adr and adw.

Nucl. Acids Res. 11, 1747 - 1757

Ouchterlony, Ö., (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis.

In: Progress in Allergy, Vol. V, (Kallos, P. ed) Karger, Basel, pp. 1 - 78

Pahlman, S., Rosengren, J., & Hjerten, S., (1977) Hydrophobic interaction chromatography on noncharged sepharose derivatives. Effects of neutral salts on the adsorption of proteins.

J. Chromatography 131, 99 - 108

Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G. & Murray, K. (1979) Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*.

Nature 282, 575 - 579

Pillot, J. and Capel, F., (1980) Heterogeneity of the HBe antigen - antibody system in human patients: distribution and partial purification of the prevalent specificity (HBe<sub>1</sub>).

Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 131, 277 - 288

Poehling, H.M. and Neuhoﬀ, V., (1981) Visualization of proteins with a silver stain: a critical analysis.

Electrophoresis 2, 141 - 147

Popper, H., Shih, J.W.K., Gerin, J.L., Wong, D.C., Hoyer, B.H., London, W.T., Sly, D.L. & Purcell, R.H., (1981) Woodchuck hepatitis and hepatocellular carcinoma: correlation of histologic with virologic observations.

Hepatology 1, 91 - 98

Prince, A.M., (1981) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma: Molecular biology provides further evidence for an etiologic association.

Hepatology 1, 73 - 75

Purcell, R.H. and Gerin, J.L., (1975) Hepatitis B subunit vaccine; Preliminary report of safety and efficacy tests in chimpanzees.

Am. J. Med. Sci. 270, 395 - 399

Purcell, R.H., Gerin, J.L., Almeida, J.R. & Holland, P.V., (1973) Radioimmunoassay for the detection of the core of the Dane particle and antibody to it.

Intervirology 2, 231 - 243

Reynolds, J.A. and Tanford, C., (1970) Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 1002 - 1003

Righetti, P.G. and Drysdale, J.W., (1975)

In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology.

Vol. 5, Part 2. (Work, T.S. and Work, E. eds). North Holland Publishing Co., Amsterdam / London

Righetti, P.G., Tudor, G. & Ek, K., (1981) Isoelectric points and molecular weight of proteins. A new table.

J. Chromatography 220, 115 - 194

Robinson, W.S., (1975) DNA and DNA polymerase in the core of the Dane particle of hepatitis B.

Am. J. Med. Sci. 270, 151 - 159

Robinson, W.S. and Greenman, R.L., (1974) DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate.

J. Virol. 13, 1231 - 1236

Robinson, W.S., Marion, P., Feitcloon, M. & Siddiqui, A., (1982) The hepadna virus group: Hepatitis B and related viruses.

In: Viral hepatitis (Szumness, W., Alter, H.J. and Maynard, J.E. eds) Franklin Inst. Press, Philadelphia, pp. 57 - 68

Roggendorf, M. und Deinhardt, F., (1982) Neuere Ergebnisse zur Struktur und Pathogenese der Hepatitis B und zur Charakterisierung ihres Erregers.

Triangel 21, 123 - 131

Rosengren, J., Pahlman, S., Glad, M. & Hjerten, S., (1975) Hydrophobic interaction chromatography on non-charged Sepharose derivatives. Binding of a model protein, related to ionic strength, hydrophobicity of the substituent, and degree of substitution (determined by NMR).

Biochim. Biophys. Acta 412, 51 - 61

Scolnick, E.M., McLean, A.A., West, D.J., McAleer, W.J., Miller, W.J. & Buynak, E.B., (1984) Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B vaccine made by recombinant DNA.

J. Am. Med. Assoc. 251, 2812 - 2815

Serrano, M.A. and Hirschman, S.Z., (1984) Properties of hepatitis B e antigen synthesized by rat cells transfected with circular DNA.

J. Gen. Virol. 65, 1373 - 1383

Shafritz, D.A. and Kew M.C., (1981) Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas.

Hepatology 1, 1 - 8

Shafritz, D.A., Shouval, D., Sherman, H.I., Hadziyannis, S.J. & Kew, M.C., (1981) Integration of hepatitis B virus DNA into the genom of liver cancer cells in chronic liver disease and hepato-cellular carcinoma.

N. Engl. J. Med. 303, 1067 - 1073

Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, J.V., (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS - polyacrylamide gels.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 815 - 820

Sninsky, J.J., Siddiqui, A., Robinson, W.S. & Cohen, S.N., (1979) Cloning and endonuclease mapping of the hepatitis B viral genom.

Nature 279, 346 - 348

Stahl, S., MacKay, P., Magazin, M., Bruce, S.A. & Murray, K., (1982) Hepatitis B virus core antigen: Synthesis in E. coli and application in diagnosis.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 1606 - 1610

Stannard, L.M. and Hodgkiss, M., (1979) Morphological irregularities in Dane particle cores.

J. Gen. Virol. 45, 509 - 514

Sternberg, C.J., (1977) A rate nephelometer for measuring specific protein by immunoprecipitin reactions.

Clin. Chem. 23, 1456 - 1464

Sternberg, M.J.E. and Thornton, J.M., (1978) Prediction of protein structure from amino acid sequence.

Nature 271, 15 - 20

Stryer, L., (1975) Biochemistry.

Freeman, W.H. & Co., San Francisco, USA

Summers, J., Smolec, J.M. & Snyder, R., (1978) A virus similar to human HBV associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 4533 - 4537

Summers, J., O'Connell, A., Maupas, P., Goudeau, A., Coursaget, P. & Drucker, J., (1978) HBV DNA in primary hepatocellular carcinoma tissue.

J. Med. Virol. 2, 207 - 214

Szmuness, W., Stevens, C.E., Harley, E.J., Zang, E.A., Olezko, W.R., William, D.C., Sadovsky, R., Morrison, J.M. & Kellner, A., (1980) Hepatitis B vaccine: Demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States.

N. Engl. J. Med. 303, 833 - 841

Szmuness, W., Stevens, C.E., Zang, E.A., Harley, E.J. & Kellner, A., (1981) A controlled clinical trial of the efficacy of the hepatitis B vaccine (Heptavax B): a final report.

Hepatology 1, 377 - 385

Takahashi, T., Nakagawa, S., Hashimoto, T., Takahashi, K., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1976) Large-scale purification of Dane particles from plasma containing hepatitis B antigen and demonstration of a circular double-stranded DNA molecule extruding directly from their cores.

J. Immunol. 117, 1392 - 1397

Takahashi, K., Imai, M., Tsuda, F., Takahashi, T., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1976) Association of Dane particles with e antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen.

J. Immunol. 117, 102 - 105

Takahashi, K., Fukuda, M., Baba, K., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1977) Determination of e antigen and antibody to e by means of passive hemagglutination method.

J. Immunol. 119, 1556 - 1559

Takahashi, K., Imai, M., Miyakawa, Y., Iwakiri, S. & Mayumi, M., (1978) Duality of hepatitis B e antigen in serum of persons infected with hepatitis B virus: evidence for the nonidentity of e antigen with immunoglobulins.

Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1952 - 1956

Takahashi, K., Akahane, Y., Gotanda, T., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1979) Demonstration of hepatitis B e antigen in the core of Dane particles.

J. Immunol. 122, 275 - 279

Takahashi, K., Imai, M., Gotanda, T., Sano, T., Oinuma, A., Mishiro, S., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1980) Hepatitis B e antigen polypeptides isolated from sera of individuals infected with hepatitis B virus: Comparison with HBeAg polypeptide derived from Dane particles.

J. Gen. Virol. 50, 49 - 57

Takahashi, K., Imai, M., Nomura, M., Oinuma, A., Machida, A., Funatsu, G., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1981) Demonstration of the immunogenicity of hepatitis B core antigen in a hepatitis B e antigen polypeptide (P19).

J. Gen. Virol. 57, 325 - 330

Takahashi, K., Machida, A., Funatsu, G., Nomura, M., Usuda, S., Aoyaki, S., Tachibana, K., Miyamoto, H., Imai, M., Nakamura, T., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1983) Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum.

J. Immunol. 130, 2903 - 2907

Tedder, R.S., (1978) Testing for e antigen and e antibody by immunodiffusion.

J. Med. Virol. 3, 51 - 57

Tedder, R.S. and Bull, F.G., (1979) Characterisation of "e" antigen associated with hepatitis B.

Clin. Exp. Immunol. 35, 380 - 389

Thomas, L., (1984) Labor und Diagnose.

Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg / Lahn

Tiollais, P., Charnay, P. & Vyas, G.N., (1981) Biology of hepatitis B virus.

Science 213, 406 - 411

Tiollais, P. and Wain-Hobson, S., (1984)

In: Advances in Hepatitis Research (Chiarsi, F.V. ed) Masson Pub.Inc., New York pp. 9 - 20

Träxler, G., (1979) Kinetische Nephelometrie. Eine neue Methode zur Bestimmung von Proteinen in der klinischen Chemie.

Medizintechnik 99, 79 - 84

Trepo, C., Hantz, O., Vitvitski, L., Chevallier, P., Williams, A., LeMaire, J.M. & Sepetjian, M., (1978) Heterogeneity and significance of HBeAg: Characterization of a third specificity( $e_3$ ).

In: Viral Hepatitis. (Vyas, G.N., Cohen, S.N. & Schmid, R. eds) The Franklin Institute Press, Philadelphia. pp. 203 - 209

Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Goodman, H.M. & Rutter, W.J., (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen.

Nature 280, 815 - 819

Vesterberg, O., Hansen, L. & Sjosten, A., (1977) Staining of proteins after isoelectric focusing in gels by new procedures.

Biochem. Biophys. Acta 491, 160 - 166

von der Helm, K., Bayerl, B., Frösner, G.G. und Deinhardt, F., (1980) A protein kinase activity in hepatitis B virus (HBV, Dane particles)  
In: Hepatitis Scientific Memoranda, März 1980, S. 5

Vyas, G.N., Peterson, D.C., Townsend, F.M., Damle, S.P. & Magnus, L.O., (1977) Hepatitis B e antigen: An apparent association with lactate dehydrogenase isoenzyme 5.  
Science 108, 1068 - 1070

Warburg, O., (1948) Wasserstoffübertragende Fermente.  
Verlag Dr. W. Saenger, Berlin

Weber, K. and Osborn, M., (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.  
J. Biol. Chem. 244, 4406 - 4412

Weil, C.R., Hilton, D.L., Wellinghoff, W., Gelb, L.D., Perrillo, R.P. & Aach, R.D., (1979) A partial characterisation of HBeAg.  
J. Inf. Dis. 139, 401 - 408

Werner, B.G., O'Connell, A.P. & Summers, J., (1977) Association of e antigen with Dane particle DNA in sera from asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 2149 - 2151

Williams A. and LeBouvier G., (1976) Heterogeneity and thermolability of "e".

In: Bibl. Haematol. No.42, S.Karger, Basel

Yoshizawa, H., Itho, H., Simonetti, J.P., Takahashi, K., Machida, A., Miyakawa, Y. & Mayumi, M., (1979) Demonstration of hepatitis B e antigen in hepatitis B core particles obtained from the nucleus of hepatocytes infected with hepatitis B virus.  
J. Gen. Virol. 42, 513 - 519

Zachoval, R., Frösner, G.G. & Deinhardt, F., (1981) Impfung gegen Hepatitis B: Ergebnisse einer Immunogenitätsstudie.  
Münch. Med. Wschr. 123, 1506 - 1508

Zuckerman, A.J., (1974) Viral hepatitis, the B antigen and liver cancer.  
Cell 1, 65 - 67

## Lebenslauf

Name: Bernhard Bayerl  
Geburtsdatum: 15.4.51  
Geburtsort: München  
Eltern: Ludwig Bayerl, Hauptsekretär  
Traudl Bayerl, geb. Geiger, Buchhalterin

1957 - 1963 Volksschule an der Schwanthalerstr., München  
1963 - 1970 Pestalozzigymnasium München  
1970 Abitur  
1970 - 1972 Wehrdienst  
WS 1972/73 Beginn des Chemiestudiums an der Technischen  
Universität München  
1974 Diplomvorprüfung  
1978 Diplomhauptprüfung  
Juni 1978 - Diplomarbeit unter Anleitung von Priv. Doz.  
Dez. 1978 Dr. S. Schneider am Institut für Physikalische  
Chemie der Technischen Universität München  
Feb. 1979 - Doktorarbeit am Max von Pettenkofer-Institut  
Juni 1984 der Universität München



## Epilog

"... es gehört heutzutage ein entsetzlicher Umfang dazu, um in den Wissenschaften komplett zu sein; es werden grausame Forderungen gemacht, und was hat man davon, nichts als die Ehre, daß alles ineinandergreift mit leeren Händen."

Clemens Brentano













